

UNIVERSITA' DELLA CALABRIA

DOTTORATO DI RICERCA

IN

“FARMACOLOGIA E BIOCHIMICA DELLA MORTE CELLULARE”

XXII Ciclo

**Valutazione elettrofisiologica degli effetti di alcune
amine biogene sui neuroni dopaminergici:
possibili coinvolgimenti nel morbo di Parkinson e
nella schizofrenia**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/14 Farmacologia

Coordinatore

Chiar.mo Prof.
Giacinto Bagetta

Docente Tutor

Chiar.mo Prof.

Nicola Biagio Mercuri

Dottoranda

Dott.ssa Ada Ledonne

INDICE

RIASSUNTO.....	4
1. INTRODUZIONE.....	8
1.1 FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA DOPAMINERGICO.....	8
1.1.1 Sistema dopaminergico mesencefalico.....	9
1.1.2 Caratteristiche dei neuroni dopaminergici nigrostriatali.....	10
1.1.3 Ruolo funzionale dei neuroni dopaminergici mesencefalici.....	15
1.1.4 Dopamina: sintesi, immagazzinamento, rilascio vescicolare e ricaptazione.....	17
1.1.5 Recettori dopaminergici.....	20
1.1.5.1 Ruolo funzionale nella SNpc.....	23
1.2 GIRK.....	24
1.2.1 Struttura e localizzazione.....	24
1.2.2 Meccanismi di modulazione.....	26
1.2.3 Ruolo fisiologico nella SNpc.....	28
1.3 AMINE IN TRACCIA.....	29
1.3.1 Cenni generali.....	29
1.3.2 Scoperta.....	31
1.3.3 Biosintesi e catabolismo.....	33
1.3.4 Localizzazione cerebrale.....	37
1.3.5 Effetti biologici delle TAs.....	38
1.3.5.1 Effetti indiretti.....	39
1.3.5.2 Effetti diretti.....	40
Recettori TAAR.....	42
Recettori sigma.....	46
Recettori ionotropi.....	47
1.3.6 Ruolo delle TAs nei disturbi neuropsichiatrici.....	47
1.3.6.1 Depressione.....	48
1.3.6.2 Schizofrenia.....	49
1.3.6.3 ADHD.....	49

1.3.6.4 Eemicrania.....	50
1.3.6.5 Morbo di Parkinson.....	51
2. SCOPO DELLA TESI.....	52
3. MATERIALI E METODI.....	53
3.1 Preparazione delle fettine mesencefaliche.....	53
3.2 Registrazioni elettrofisiologiche su fettina.....	54
3.3 Topi TA ₁ KO.....	57
3.4 Preparazione degli oociti di Xenopus.....	58
3.5 Registrazioni elettrofisiologiche su oociti.....	59
3.6 Farmaci.....	60
3.7 Analisi dei dati.....	61
4. RISULTATI.....	62
4.1 Le TAs riducono risposte attivate dal D2 sui neuroni dopaminergici.....	62
4.2 L'effetto delle TAs sulle correnti GIRK D2-attivate è modificato durante manipolazioni delle loro vie metaboliche.....	65
4.3 Il recettore TA ₁ non è responsabile degli effetti modulatori delle TAs sulle correnti GIRK.....	68
4.4 Gli effetti delle TAs non sono dipendenti dall'attivazione dei recettori σ	71
4.5 Le TAs modulano negativamente le correnti GIRK.....	72
4.6 Le TAs riducono le correnti GIRK attivate dal D2 attraverso un meccanismo indipendente dalle proteine G.....	74
4.7 Le TAs non modificano le correnti GIRK espresse in oociti di Xenopus.....	76
5. DISCUSSIONE.....	80
6. BIBLIOGRAFIA.....	88

RIASSUNTO

I neuroni dopaminergici mesencefalici controllano importanti funzioni quali l'attività locomotoria, l'apprendimento e la motivazione e risultano implicati in numerosi disturbi neuropsichiatrici tra cui la schizofrenia, il morbo di Parkinson, la depressione, le dipendenze e l'ADHD. Pertanto la comprensione dei meccanismi fisiologici che ne regolano l'attività può avere numerose e rilevanti implicazioni.

Le amine in traccia (TAs) sono una classe di composti endogeni correlati ai neurotrasmettitori monoaminergici (dopamina, noradrenalina e serotonina) dal punto di vista della struttura chimica, delle vie metaboliche di sintesi e catabolismo e della distribuzione tissutale. Evidenze cumulative documentano l'espressione delle amine in traccia nel SNC di mammifero, con particolare riferimento al sistema dopaminergico mesencefalico. Tuttavia il ruolo fisiologico svolto da tali amine endogene nella modulazione dell'attività neuronale in quest'area non è stato ancora del tutto delucidato. Classicamente le TAs sono state considerate solo falsi neurotrasmettitori per la loro capacità di indurre rilascio di catecolamine. La scoperta recente di una nuova classe di recettori associati a proteine G specificatamente attivati da tali amine endogene, unitamente all'osservazione che le TAs sono in grado di legare altre classi recettoriali, quali i recettori sigma (σ), suggerisce che le TAs potrebbero modulare direttamente l'attività neuronale.

Lo scopo primario del presente lavoro è stato lo studio degli effetti esercitati dalle amine in traccia sulle risposte dopaminergiche conseguenti all'attivazione dei recettori D2. A tal fine sono state effettuate registrazioni elettrofisiologiche intracellulari di neuroni dopaminergici della sostanza nera pars compacta (SNpc) utilizzando fettine mesencefaliche di topo. I risultati ottenuti dimostrano che le TAs, β -feniletilamina (β -PEA) e tiramina (Tyr), riducono in maniera reversibile e concentrazione-dipendente, le correnti outward indotte dall'attivazione dei recettori D2, ottenuta perfondendo l'agonista selettivo D2, quinpirolo.

Inoltre sono stati indagati i meccanismi cellulari alla base degli effetti modulatori delle TAs al fine di identificare il bersaglio molecolare da queste attivato. In particolare è stato valutato il coinvolgimento dei recettori TA₁ negli effetti indotti dalle TAs utilizzando sia strategie genetiche che farmacologiche.

I dati qui riportati indicano che in neuroni dopaminergici di topi TA₁ KO, l'effetto inibitorio delle TAs sulle correnti GIRK attivate dal D2 è ancora presente e agonisti selettivi per il TA₁ non sono in grado di riprodurre l'inibizione delle correnti GIRK prodotta dalle TAs. I risultati ottenuti escludono pertanto il coinvolgimento del recettore TA₁ nell'effetto inibitorio delle TAs.

Il ruolo dei recettori σ , per i quali le TAs mostrano affinità di legame, negli effetti modulatori da queste prodotti è stato studiato utilizzando antagonisti selettivi per i due sottotipi recettoriali, σ 1 e σ 2. L'inibizione delle correnti GIRK

attivate dal D2 prodotta dalle TAs persiste anche in presenza degli antagonisti σ , indicando che l'effetto modulatorio delle TAs non è mediato da tale classe recettoriale.

Ulteriori esperimenti sono stati effettuati al fine di valutare il coinvolgimento di meccanismi dipendenti dall'attivazione di proteine G nell'effetto di riduzione delle risposte mediate dal D2 prodotto dalle TAs. In neuroni dopaminergici caricati con GTP γ S, l'effetto delle TAs sulle correnti GIRK è ancora presente e reversibile a differenza di altri eventi mediati dall'attivazione di proteine G. Pertanto i risultati ottenuti indicano che meccanismi dipendenti dall'attivazione di proteine G non sono responsabili dell'effetto inibitorio delle TAs sulle correnti GIRK attivate dal D2.

Attraverso l'utilizzo di sistemi di espressione eterologa è stato studiato l'effetto diretto delle TAs sui canali GIRK e sui recettori D2. I dati qui mostrati dimostrano che le correnti GIRK espresse in oociti di *Xenopus* non sono alterate dall'applicazione di β -PEA e le TAs non interferiscono con l'attivazione dei GIRK indotta dalla DA in oociti che co-esprimono il GIRK ed il D2.

In conclusione i dati riportati dimostrano che le TAs, β -PEA e tiramina, riducono reversibilmente e in maniera dipendente dalla concentrazione, le risposte dopaminergiche mediate dal recettore D2 in neuroni dopaminergici della SNpc. Sebbene il meccanismo d'azione alla base dell'effetto inibitorio delle TAs sulle correnti GIRK non è stato completamente chiarito, i risultati ottenuti escludono il coinvolgimento dei recettori TA₁ e sigma oltre che la

partecipazione di meccanismi mediati da proteine G e scartano l'ipotesi che le TAs inibiscano direttamente il GIRK e il D2.

Considerato il ruolo inibitorio dei recettori D2 sull'attività elettrica dei neuroni dopaminergici della SNpc, l'effetto delle TAs può rendere i neuroni dopaminergici maggiormente eccitabili ed avere rilevanze in patologie in cui è stata riscontrata un'alterazione della trasmissione dopaminergica.

1. INTRODUZIONE

1.1 FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA DOPAMINERGICO

La dopamina (DA) è stata annoverata tra i neurotrasmettitori alla fine degli anni '50 (Carlsson et al., 1958) ed è ormai noto che riveste un ruolo estremamente importante nel sistema nervoso centrale (SNC) di mammifero dove controlla numerose funzioni tra cui l'attività locomotoria, l'apprendimento, l'emozione, la motivazione, il comportamento alla base dell'assunzione di cibo e la regolazione endocrina.

Prima di essere riconosciuta come neurotrasmettitore indipendente, la dopamina veniva considerata un semplice prodotto intermedio della sintesi delle monoamine, noradrenalina e adrenalina. L'ipotesi di un ruolo biologico indipendente scaturì dalla quantificazione dei livelli di espressione della dopamina nel SNC, comparabili a quelli di altri neurotrasmettitori, e dalla distribuzione differente rispetto alle altre catecolamine (Carlsson et al., 1958). La successiva identificazione di specifiche popolazioni neuronali contenenti dopamina e la loro distribuzione anatomica fu possibile grazie al lavoro di Falck e Hillarp (1962), che utilizzarono una tecnica a fluorescenza basata sulla condensazione delle monoamine con la formaldeide. Dahlstrom e Fuxe (1964) in seguito fornirono una descrizione più dettagliata del sistema dopaminergico nel cervello di ratto e stabilirono la nomenclatura dei gruppi cellulari contenenti monoamine che è ancora oggi adottata (Dahlstrom & Fuxe, 1964).

1.1.1 Sistema dopaminergico mesencefalico

Nel mesencefalo i neuroni dopaminergici sono localizzati principalmente in tre nuclei denominati, secondo la classificazione di Dahlstrom & Fuxe (1964), A8, A9 e A10. Il gruppo A8 corrisponde all'area retrobulbare (RRA), mentre i gruppi A9 ed A10 sono rappresentati rispettivamente dalla sostanza nera pars compacta (SNpc) e dall'area tegmentale ventrale (VTA) (Dahlstrom *et al.*, 1964). Questi nuclei sono organizzati in due sistemi principali, nigrostriatale e mesolimbocorticale, che vengono definiti in accordo alle rispettive aree di proiezione (Bjorklund, 1984) (FIG 1). Il sistema nigrostriatale origina nella SNpc e proietta a livello dello striato dorsale, nuclei caudato e putamen (Ande'n *et al.*, 1964) mentre il sistema mesolimbocorticale parte dalla VTA innervando aree limbiche dello striato ventrale (nucleus accumbens), amigdala, tubercolo olfattorio, corteccia prefrontale, cingolata ed entorinale (Ande'n *et al.*, 1966; Bjorklund, 1984; Ungerstedt, 1971). I neuroni dopaminergici dell'area retrorubrale proiettano allo striato dorsale e possono essere considerati un'estensione caudale della SNpc (Ungerstedt *et al.*, 1971; Nauta *et al.*, 1978). Oltre ai sistemi mesencefalici che contengono circa il 70-75 % dei neuroni dopaminergici cerebrali, a livello del SNC è stato identificato un altro sistema dopaminergico definito tuberipofisiario che si origina nei nuclei arcuato e periarcuato dell'ipotalamo (gruppo A12) e proietta nell'ipofisi e all'eminenza mediana.

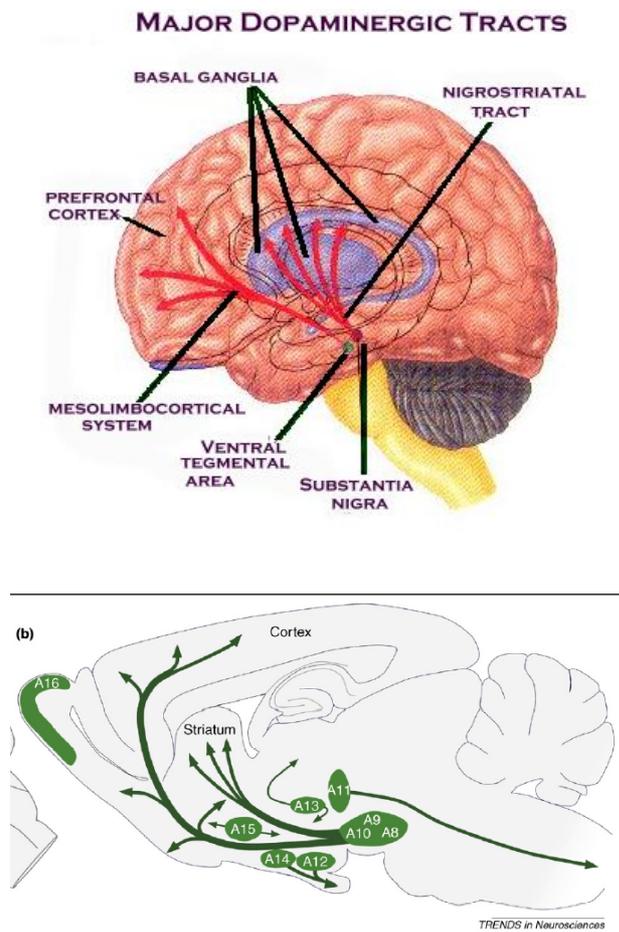


FIG. 1 Localizzazione delle principali vie dopaminergiche nel cervello umano (A) e di roditore (B)

1.1.2 Caratteristiche dei neuroni dopaminergici nigrostriatali

Attraverso tecniche di colorazione con il metodo di Golgi (Mingazzini, 1988; Cajal 1911) è stato possibile individuare due zone distinte all'interno della SN: la *pars compacta* e la *pars reticulata*, che si differenziano per l'organizzazione

cellulare e per l'espressione di popolazioni neuronali distinte. La SN reticolata è caratterizzata dalla presenza di neuroni GABAergici sparsi tra numerose fibre, derivanti dallo striato oltre che dalla SNpc, organizzate come una rete mentre la pars compacta è caratterizzata dalla presenza di numerosi neuroni per lo più dopaminergici strettamente compattati tra loro.

I neuroni della SNpc sono stati caratterizzati attraverso l'uso di tecniche immunostochimiche e mediante studi elettrofisiologici sia *in vivo* che *in vitro*.

Da un punto di vista morfologico i neuroni dopaminergici della SNpc sono caratterizzati da un corpo cellulare fusiforme, ovoidale o poligonale di dimensioni comprese tra 6-33 μm di diametro. Dai corpi cellulari emerge l'assone e 3-6 dendriti principali che formano una densa arborizzazione che, oltre a formare contatti con l'albero dendritico delle cellule vicine, si estende anche nella SN reticolata. E' stata notata anche la presenza diffusa di autapsi (sinapsi formate tra terminazioni e dendriti principali dello stesso neurone - vedi Bentivoglio & Morelli, 2005; Karabelas & Purpura, 1980).

Per quanto riguarda le proprietà elettriche, i neuroni dopaminergici registrati *in vivo*, mediante tecniche elettrofisiologiche extracellulari ed intracellulari su ratti anestetizzati, presentano una modalità di firing irregolare che consiste in bursts di potenziali d'azione seguiti da oscillazioni depolarizzanti del potenziale di membrana mediate dal calcio. Il potenziale d'azione ha una forma caratteristica e la fase di depolarizzazione è lenta ($> 2 \text{ ms}$) (Aghajanian & Bunney, 1973; Grace & Bunney, 1983).

I neuroni dopaminergici registrati *in vitro* utilizzando fettine mesencefaliche di ratto presentano una modalità di firing differente rispetto a quella ottenuta da tecniche elettrofisiologiche in vivo, probabilmente a causa dell'eliminazione, durante la procedura di preparazione delle fettine, di afferenze sinaptiche che ne regolano l'attività.

Studi *in vitro* su fettine mesencefaliche hanno permesso di identificare, all'interno della SNpc, due popolazioni neuronali che presentano caratteristiche elettrofisiologiche distinte (Lacey et al., 1989; Johnson & North, 1992). La prima classe, che raggruppa la maggior parte dei neuroni della SNpc, è rappresentata dai "neuroni principali" dopaminergici (Grace & Onn, 1989) mentre la seconda popolazione, "neuroni secondari", è costituita da interneuroni GABAergici (Mugnaini & Verte, 1985).

I neuroni dopaminergici *in vitro* presentano attività di firing spontanea ad un frequenza costante compresa tra 0.5-4 Hz, con potenziali d'azione lenti (>2 ms) caratterizzati da un'evidente after-iperpolarizzazione (AHP). Sono inoltre caratterizzati dalla presenza di una corrente inward in risposta a stimoli iperpolarizzanti (I_h) e producono una corrente iperpolarizzante in risposta all'applicazione di dopamina (Grace & Onn, 1989; Mercuri et al., 1995).

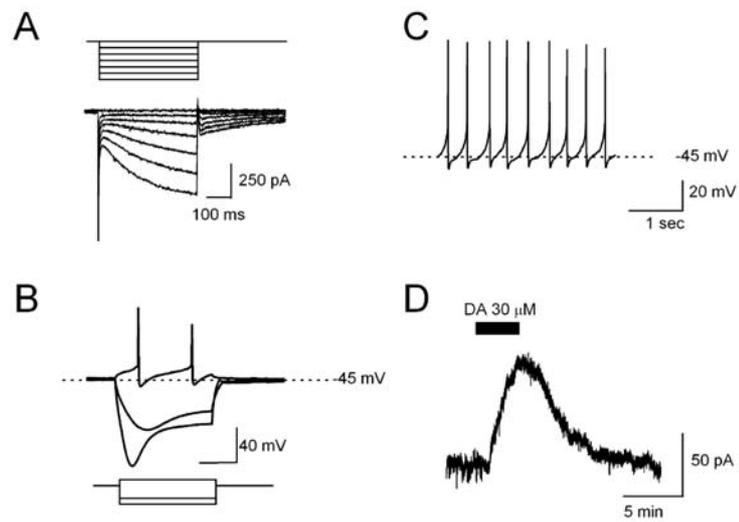


FIG. 2 Caratteristiche elettrofisiologiche di un neurone dopaminergico della SNc registrato mediante la tecnica di registrazione intracellulare con microelettrodo in vitro

Le caratteristiche elettriche permettono di distinguere facilmente i neuroni dopaminergici dagli interneuroni GABAergici che presentano una modalità di firing irregolare o silente, potenziali d'azione più corti (<1.5 ms), risultano insensibili all'applicazione di dopamina mentre sono inibiti dagli oppioidi (Lacey et al., 1989; Johnson & North, 1992).

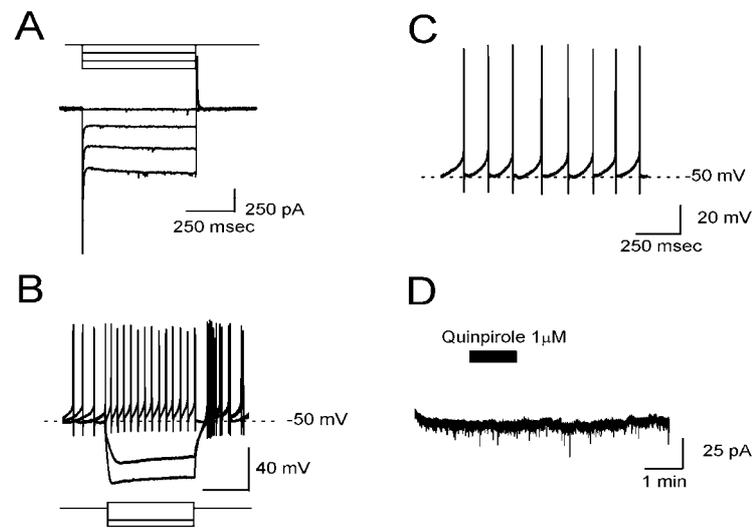


FIG. 3 Caratteristiche elettrofisiologiche di un interneurone GABAergico della SNc registrato mediante la tecnica di registrazione intracellulare con microelettrodo in vitro

L'attività dei neuroni dopaminergici della SNpc è modulata dall'integrazione di afferenze sinaptiche di diverso tipo in quanto la SNpc riceve inputs glutamatergici, GABAergici, colinergici, serotoninergici e noradrenergici (Grillner & Mercuri, 2002).

Le afferenze glutamatergiche derivano principalmente dalla corteccia prefrontale, dal nucleo subtalamico e dai nuclei tegmentali laterodorsale e peduncolopontino (Svensson & Tung, 1989).

Gli inputs GABAergici provengono da neuroni di proiezione dello striato, del pallido (Fonnum et al., 1978; Bolam & Smith, 1990) e della SN reticolata oltre che da interneuroni presenti nella SNpc.

Le afferenze colinergiche derivano principalmente dal nucleo tegmentale peduncolopontino (Beninato & Spencer, 1987) e in misura minore dal tegmento laterodorsale mentre le fibre noradrenergiche e serotoninergiche derivano rispettivamente dal locus coeruleus (Phillipson, 1979) e dal nucleo del rafe (Dray et al., 1976).

1.1.3 Ruolo funzionale dei neuroni dopaminergici

I neuroni dopaminergici del mesencefalo sono coinvolti nel controllo del movimento volontario e della postura, nella regolazione dei comportamenti legati alla ricompensa e alla motivazione e in funzioni cognitive.

Il sistema dopaminergico nigrostriatale è criticamente coinvolto nella patogenesi del morbo di Parkinson (Carlsson, 1959) in quanto la degenerazione dei neuroni dopaminergici della SNpc è direttamente responsabile dei sintomi tipici della malattia quali bradicinesia, instabilità posturale, rigidità e tremore a riposo. Nella malattia di Parkinson, il deficit di DA a livello striatale induce modificazioni della funzionalità dei gangli della base per cui si ha un'iperattivazione della via indiretta, che normalmente inibisce la corteccia motoria e i movimenti volontari. L'importanza della DA nella sintomatologia del Parkinson è confermata dall'efficacia della terapia con L-DOPA, precursore

diretta della DA, introdotta su suggerimento di Carlsson (1959) da Birkmayer e Hornykiewicz nel 1961 e che rappresenta ancora oggi il trattamento di scelta per la cura della malattia (Mercuri & Bernardi, 2005).

I neuroni dopaminergici del sistema mesolimbocorticale sono principalmente implicati nella regolazione dei comportamenti legati alla gratificazione (Di Chiara et al., 1995; Schultz, 1998; Berridge, 2007) e rappresentano il bersaglio di numerose sostanze con elevato potenziale d'abuso, quali cocaina, amfetamina, oppioidi, etanolo e nicotina, che producono un aumento nel rilascio di DA nelle aree di proiezione (Di Chiara & Imperato, 1988).

La via mesocorticale che origina nella VTA e proietta nella corteccia prefrontale è coinvolta nella regolazione di funzioni cognitive quali la memoria di lavoro (working memory), attività di pianificazione ed esecuzione e il mantenimento dell'attenzione (Wise, 2004; Humphries & Prescott, 2010).

Numerose evidenze indicano che il sistema dopaminergico mesencefalico è coinvolto nella sintomatologia della schizofrenia. La classica "teoria della DA" (Snyder, 1976) basata sul fatto che tutti i farmaci antipsicotici utilizzati possiedono attività antidopaminergica e che sostanze che indirettamente facilitano la trasmissione dopaminergica aggravano la psicosi, indicava un'iperdopaminergia alla base della schizofrenia. Successivamente tale ipotesi è stata rivisitata (Davis et al., 1991), suggerendo che i sintomi della schizofrenia sono causati da un'alterazione area-specifica della trasmissione dopaminergica, con un'ipodopaminergia a livello della corteccia prefrontale ed

iperdopaminergia nelle aree mesolimbiche. Recentemente è stata proposta una terza versione della teoria della dopamina (Howes & Kapur, 2009), che postula che l'alterazione della trasmissione dopaminergica striatale a livello presinaptico sia maggiormente responsabile della sintomatologia della schizofrenia.

Alterazioni della trasmissione dopaminergica sono coinvolte nella patogenesi di altri disturbi neuropsichiatrici quali il disordine dell'attenzione ed iperattività (ADHD), la sindrome di Tourette, la depressione e le dipendenze.

1.1.4 Dopamina: sintesi, immagazzinamento, rilascio e ricaptazione

La dopamina viene sintetizzata a partire dagli aminoacidi essenziali fenilalanina e tirosina all'interno dei neuroni dopaminergici. La tirosina, derivante dalla dieta o direttamente prodotta dalla L-fenilalanina, viene idrossilata dall'enzima tirosina idrossilasi (TH) con formazione della L-3,4-diidrossifenilalanina (L-DOPA), che rappresenta il precursore della dopamina. Successivamente, mediante una decarbossilazione ad opera dell'enzima decarbossilasi degli aminoacidi aromatici (AADC) si ha la conversione da L-DOPA a dopamina.

Il passaggio biosintetico catalizzato dall'enzima TH è il più lento e costituisce il fattore limitante la sintesi della dopamina.

Una volta sintetizzata, la dopamina è presente sia in forma libera all'interno del citoplasma sia nelle vescicole sinaptiche dove viene accumulata mediante un meccanismo attivo da un trasportatore che sfrutta il gradiente di pH

vescicola/citoplasma prodotto da una pompa protonica vescicolare (VMAT2). Il rilascio esocitotico di dopamina nello spazio extracellulare avviene in seguito a depolarizzazione neuronale, apertura dei canali al Ca^{2+} voltaggio-dipendenti e ingresso di calcio all'interno dei neuroni con l'attivazione della macchina molecolare preposta alla mobilitazione e rilascio del neurotrasmettitore.

I neuroni dopaminergici presentano una caratteristica peculiare: sono capaci di sintetizzare, accumulare e rilasciare dopamina anche a livello del corpo cellulare e dei dendriti, oltre che nelle terminazioni neuronali. La presenza di dopamina nei dendriti è stata descritta per la prima volta da Björklund e Lindvall (1975). Da allora numerose evidenze anatomiche, elettrofisiologiche e biochimiche hanno dimostrato che la dopamina è accumulata e rilasciata dai dendriti dei neuroni dopaminergici nigrali e svolge un ruolo autoregolatorio sull'attività degli stessi neuroni dopaminergici (Okaoka et al., 1992; Falkenburger et al., 2001; Groves et al., 1975; Lacey et al., 1987) oltre che sulle cellule non dopaminergiche presenti all'interno della SN (Ruffieux & Schultz, 1980; Waszczak & Walters, 1980; Waszczak, 1990).

I segnali trasmessi dalla dopamina attraverso l'attivazione di specifici recettori, vengono interrotti in seguito alla ricaptazione del neurotrasmettitore dallo spazio extracellulare oppure mediante meccanismi catabolici.

La ricaptazione è un meccanismo attivo che avviene per mezzo del trasportatore di membrana della dopamina (DAT) appartenente alla famiglia di trasportatori Na^+/Cl^- dipendenti che include anche i trasportatori per adrenalina, serotonina,

GABA e glicina. Il DAT sfrutta il gradiente transmembrana del Na^+ , generato da una pompa Na^+/K^+ ATPasica per operare il co-trasporto del neurotrasmettitore substrato e di ioni Cl^- all'interno delle terminazioni presinaptiche e pertanto limita il tempo di interazione della dopamina con i recettori.

La DA viene degradata da due sistemi enzimatici diversi: la monoaminossidasi (MAO) e la catecol-O-metiltransferasi (COMT). In seguito alla ricaptazione dallo spazio extracellulare, la DA viene convertita in acido diidrossifenilacetico (DOPAC) dalle MAO intracellulari mentre nello spazio extracellulare la DA viene trasformata in acido omovanillico (HVA) mediante l'azione combinata delle COMT e delle MAO.

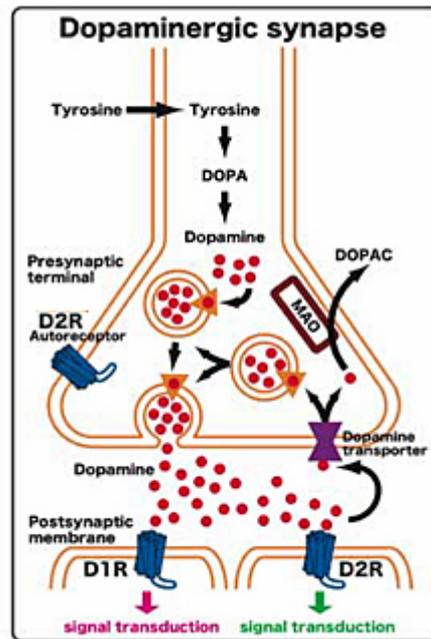


FIG. 4 Sinapsi dopaminergica

1.1.5 Recettori dopaminergici

La prima evidenza per l'esistenza di recettori dopaminergici nel SNC risale al 1972 quando, attraverso studi biochimici, è stato dimostrato che la dopamina stimola l'adenilato ciclasi (AC). Successivamente, sulla base di evidenze farmacologiche e biochimiche, è stata proposta l'esistenza di due classi recettoriali distinte, una accoppiata all'adenilato ciclasi e l'altra indipendente da tale sistema enzimatico intracellulare. In particolare evidenze sperimentali dimostrarono che alcune azioni della dopamina, quali l'effetto di inibizione del rilascio della prolattina nell'ipofisi, non erano mediate dalla stimolazione

dell'AC (Caron et al., 1978) e noti antagonisti dei recettori dopaminergici, quali la sulpiride, non bloccavano la formazione dell'cAMP indotta dalla DA nello striato (Spano et al., 1978). Nel 1979, Kebabian e Calne hanno proposto una prima nomenclatura per i recettori dopaminergici, classificando come recettore D₁ quello che attiva l'AC e recettore D₂ quello che non è accoppiato a tale effettore (Kebabian & Calne, 1979; Missale et al., 1998). Successivamente numerosi studi biochimici, elettrofisiologici e farmacologici hanno confermato la veridicità di tale classificazione e, sebbene nel corso degli anni sono stati identificati 5 diversi recettori dopaminergici, è ormai noto che tutti i sottotipi recettoriali rientrano nelle due classi originariamente identificate (Missale et al., 1998).

I recettori dopaminergici appartengono alla famiglia dei recettori associati a proteine G (GPCRs) e sono costituiti da 7 regioni transmembrana, dall'estremità C-terminale intracellulare e da quella N-terminale extracellulare. Esistono differenze strutturali tra le due famiglie D₂ e D₁ in quanto questi ultimi presentano l'estremità C-terminale più lunga e la porzione intracellulare compresa tra il 3 e 4 segmento transmembrana più corta rispetto alla famiglia dei D₂.

La famiglia dei recettori D₁ include il sottotipo D₁ e il sottotipo D₅. Si tratta di recettori associati a proteine G di tipo G_s e G_{olf}, la cui attivazione comporta stimolazione dell'adenilato ciclasi e produzione dell'cAMP, attivazione della protein chinasi A-cAMP dipendente (PKA) e della protein chinasi C (PKC)

oltre a attivazione della fosfolipasi C (Missale et al., 1998). I recettori della sottofamiglia D1 sono localizzati prevalentemente a livello postsinaptico nelle aree di proiezione del sistema dopaminergico (nello striato, sui neuroni GABAergici spinosi).

La famiglia dei recettori D2 include i sottotipi D2, D3 e D4. Il D2 è stato il primo recettore dopaminergico ad essere clonato (Bunzow et al., 1988) ed è presente in due differenti isoforme, generate da splicing alternativo, denominate short (D2_S) e long (D2_L) in base alla presenza di una sequenza aminoacidica aggiuntiva a livello del terzo loop intracellulare (Del Toso et al., 1989; Giros et al., 1989). L'isoforma D2_S, che è altamente espressa a livello somatico ed assonale, è predominante nel mesencefalo e nell'ipotalamo mentre il recettore D2_L, che è espresso principalmente a livello postsinaptico, prevale nello striato e nel nucleus accumbens (Khan et al., 1998; Tan et al., 2002).

I recettori della famiglia D2 sono accoppiati a proteine G di tipo G_{i/o} che inducono inibizione dell'AC, chiusura di canali al calcio, attivazione di canali al K⁺ e stimolazione della fosfolipasi A₂.

Le caratteristiche farmacologiche e biochimiche che differenziano i vari recettori dopaminergici sono schematizzate nella tabella seguente (Fig. 5):

Nomenclature	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅
Other names	D _{1A}	–	–	–	D _{1B}
Ensembl ID	ENSG00000184845	ENSG00000149295	ENSG00000151577	ENSG00000069696	ENSG00000169676
Principal transduction	G _s , G _{αf}	G _{βo}	G _{βo}	G _{βo}	G _s
Selective agonists	R(+)-SKF81297, R(+)-SKF38393	–	PD128907	PD168077, A412997 (Moreland <i>et al.</i> , 2005)	–
Selective antagonists	SCH23390, SKF83566, SCH39166	Raclopride, domperidone	S33084 (9.6, Millan <i>et al.</i> , 2000), nafadotride (9.5), (+)-514297 (8.7, Millan <i>et al.</i> , 1994), SB277011 (7.5, Reavill <i>et al.</i> , 2000)	L745870 (9.3), U101958 (8.9, Schlachter <i>et al.</i> , 1997), L741742 (8.5)	–
Probes	[³ H]-SCH23390 (0.2 nM), [¹²⁵ I]-SCH23982 (0.7 nM)	[³ H]-Raclopride, [³ H]-spiperone	[³ H]-7-OH-DPAT, [³ H]-PD128907, [³ H]-spiperone	[³ H]-NGD941 (5 nM, Primus <i>et al.</i> , 1997), [¹²⁵ I]-L750667 (1 nM, Patel <i>et al.</i> , 1996), [³ H]-spiperone	[¹²⁵ I]-SCH23982 (0.8 nM) [³ H]-SCH23390 (0.5 nM)

FIG. 5 Caratteristiche distintive dei recettori dopaminergici

1.1.5.1 Recettori dopaminergici e SNpc

L'effetto della dopamina in una determinata area cerebrale dipende dal sottotipo recettoriale espresso. La distribuzione dei recettori dopaminergici è eterogenea per quanto riguarda la densità ed il sottotipo recettoriale (Palacios *et al.* 1988; Civelli *et al.* 1991; Lahti *et al.* 1995) ed esistono differenze anche in relazione alla localizzazione sinaptica. In particolare i recettori D1, D5 e D4 sono prevalentemente postsinaptici mentre i recettori D2 e D3 sono situati sia a livello postsinaptico che presinaptico, dove agiscono da autorecettori (Sesack *et al.*, 1994).

Nella SNpc i recettori D1 sono espressi debolmente (Dawson *et al.*, 1998) e risultano localizzati sulle terminazioni GABAergiche della via striatonigrale (Savasta *et al.*, 1986) mentre non sono presenti nei neuroni dopaminergici (Levey *et al.*, 1993; Bentivoglio & Morelli, 2005).

I recettori D2 risultano fortemente espressi nella SNpc e sono localizzati a livello del corpo cellulare e dei dendriti dei neuroni dopaminergici (Levey et al., 1993; Yung et al., 1994), dove svolgono il ruolo di autorecettori (Morelli et al., 1987). L'attivazione degli autorecettori D2 si traduce in inibizione dei neuroni dopaminergici della SNpc e pertanto risulta in un ridotto rilascio di dopamina nelle aree di proiezione striatali. Il meccanismo inibitorio prevede l'apertura di GIRK, canali al K^+ attivati dalle proteine G di tipo $G_{i/o}$ accoppiate ai D2 (Lacey et al., 1987).

1.2 GIRK

1.2.1 Struttura e localizzazione

I GIRK, anche denominati Kir3, sono canali al K^+ a rettificazione interna (*inwardly rectifying*) aperti da proteine G. Il termine “rettificazione entrante” si riferisce alla forma della curva I-V del canale al potenziale d'inversione, corrispondente al potenziale di equilibrio del K^+ (E_k) dal momento che a potenziali di membrana superiori all' E_k , si ha una corrente outward estremamente piccola se paragonata alla corrente inward prodotta a potenziali inferiori all' E_k , per cui la curva I-V presenta una distorsione entrante. La rettificazione è dovuta all'occlusione del poro ionico che si verifica a potenziali superiori all' E_k ad opera del Mg^{2+} intracellulare e di poliamine (Yamada et al., 1998).

In condizioni fisiologiche il potenziale di riposo dei neuroni è poco superiore all' E_k per cui il GIRK produce una piccola corrente outward che stabilizza il potenziale di riposo e riduce l'eccitabilità neuronale (Luscher & Slesinger, 2010). Dal punto di vista strutturale i GIRK sono tetrameri costituiti dall'assemblaggio omologo o eterologo di 4 subunità ognuna formata da due regioni transmembrana (M1 e M2), da una regione intermedia che delimita il poro ionico e dalle porzioni N- e C-terminali che sono disposte sul versante citoplasmatico.

I mammiferi esprimono 4 subunità dei canali GIRK: GIRK1 (o Kir 3.1), GIRK2 (o Kir 3.2), GIRK 3 (o Kir 3.3), GIRK4 (o Kir 3.4). Nel cervello le subunità GIRK1-3 sono comuni mentre la GIRK4, debolmente espressa, non contribuisce in modo sostanziale alle correnti GIRK cerebrali (Wichman et al., 2000). Per quanto riguarda la subunità GIRK2, è stata riportata l'esistenza di tre diverse varianti di splicing, GIRK2a-c, che differiscono per la lunghezza dell'estremità C-terminale (Isomoto et al., 1996; Inanobe et al., 1999). Normalmente i GIRK sono canali eterotetramerici; la subunità GIRK2, a differenza delle altre, può dar luogo a canali omotetramerici funzionanti oltre che eterotetrameri (Luscher & Slesinger, 2010). I GIRK sono distribuiti diffusamente nel SNC dove la forma predominante è l'eterotetramero GIRK1-GIRK2 (Liao et al., 1996); una particolarità riguarda la SNpc che esprime esclusivamente GIRK omotetrameri costituiti dalla subunità GIRK2 (Inanobe et al., 1999).

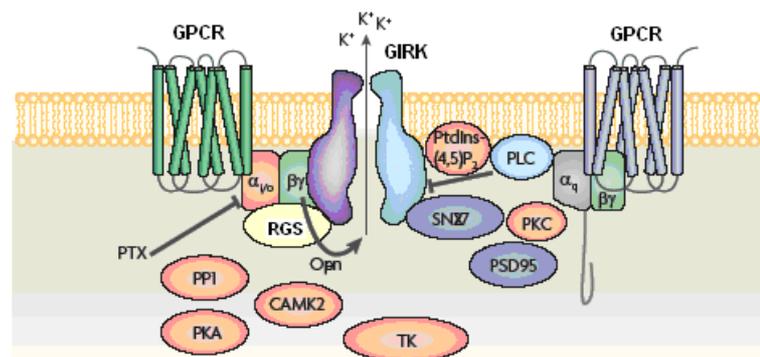
1.2.2 Meccanismi di modulazione dei GIRK

I GIRK rappresentano gli effettori di diversi recettori associati a proteine G (GPCR) attivati da classi differenti di neurotrasmettitori tra cui acetilcolina, dopamina, oppioidi, serotonina, somatostatina, adenosina e GABA. Attualmente il meccanismo più accreditato prevede che i GIRK siano attivati direttamente dall'eterodimero $\beta\gamma$, rilasciato dalle proteine G PTX-sensibili (G_i/G_o) in seguito al legame del ligando (Logothetis et al., 1987; Wickman et al., 1994). Le subunità $G\alpha_i$ e $G\alpha_o$ sono ritenute comunque importanti per la regolazione dei GIRK in quanto influenzano la specificità del recettore e l'attività basale del canale (Peleg et al., 2002; Clancy et al., 2005; Rubinstein et al., 2009).

L'attività dei GIRK può essere regolata in diversi modi tra cui il legame diretto di modulatori, tramite fosforilazione e mediante meccanismi che interferiscono con l'accoppiamento tra GPCR e GIRK. Sono stati individuati all'interno del canale siti di legame specifici per modulatori, quali il Na^+ e l'etanolo, che inducono attivazione dei GIRK. La fosforilazione dei GIRK può portare sia all'aumento che alla riduzione dell'attività del canale. In particolare è stato notato che la PKA induce attivazione (Mullner et al., 2000) mentre la PKC produce inibizione del GIRK (Mao et al., 2004), che risulta modulato anche dalla tirosin chinasi (TK), da una chinasi Ca^{2+} -calmodulina dipendente (CAMK2) e dalla protein fosfatasi 1 (PP1) (Lüscher & Slesinger, 2010).

Inoltre cambiamenti nei livelli del fosfolipide di membrana, fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP_2) influenzano l'attività dei GIRK (Huang et al., 1998; Zhang

et al., 1999) in quanto il PIP₂ stabilizza il legame tra Gβγ e GIRK, che si verifica dopo l'attivazione dei GPCR ed è responsabile dell'apertura del canale. Pertanto l'attivazione di recettori associati a proteine G_{q/11}, che attraverso l'attivazione della fosfolipasi C (PLC) produce una riduzione dei livelli di PIP₂, rappresenta un possibile meccanismo di inibizione dei GIRK (Cho et al., 2005). L'attività dei GIRK può essere modulata anche da un gruppo di proteine, denominate RGS (regolatori della trasduzione delle proteine G) che regolano la durata di attivazione delle proteine G, accelerandone l'attività GTPasica (Inanobe et al., 2001; Ishii et al., 2002; Abramow-Newerly et al., 2006) e pertanto influenzano negativamente l'accoppiamento tra GPCR e GIRK (Labouèbe et al., 2007).



Luscher & Slesinger, 2010

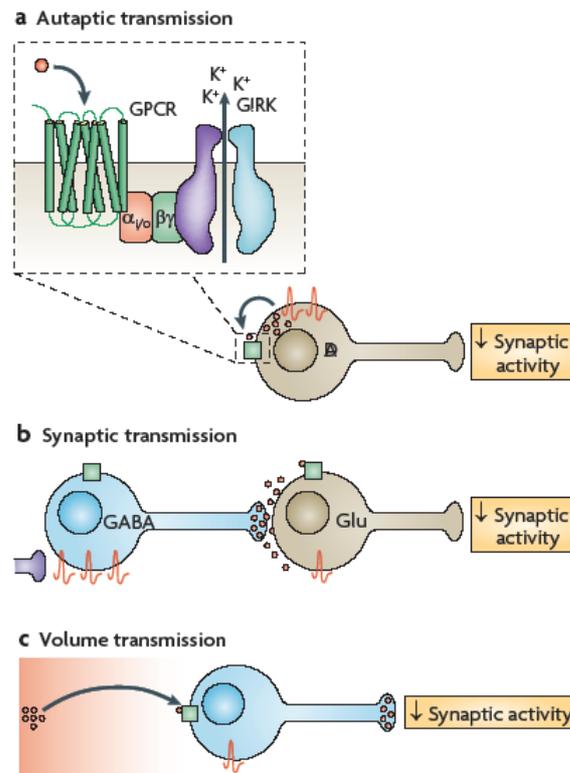
FIG. 6 Meccanismi di modulazione dei GIRK

1.2.3 Ruolo fisiologico dei GIRK e SNpc

L'attivazione fisiologica dei GIRK può modulare il comportamento di reti neuronali in diverse aree cerebrali ed a diversi livelli (Luscher & Slesinger, 2010). L'attività basale dei canali GIRK contribuisce al potenziale di riposo dei neuroni, spostando il potenziale di membrana di approssimativamente -8 mV (Luscher et al., 1997) e tale iperpolarizzazione riduce l'eccitabilità elettrica.

Inoltre l'attivazione dei GIRK, operata dai neurotrasmettitori che attivano GPCRs accoppiati a proteine $G_{i/o}$, produce un ulteriore grado di inibizione ed è coinvolta in meccanismi che riducono l'eccitabilità neuronale a livello dello stesso neurone che ha rilasciato il neurotrasmettore (inibizione autaptica), di neuroni vicini (inibizione sinaptica) e di gruppi di neuroni, attraverso la diffusione extracellulare del neurotrasmettore (inibizione di reti neuronali) (Fig. 7).

I neuroni dopaminergici della SNpc sono soggetti ad inibizione autaptica in quanto la dopamina rilasciata a livello somatodendritico attiva i recettori D2 che inducono l'apertura dei GIRK con conseguente iperpolarizzazione neuronale e riduzione del firing. Inoltre anche l'attivazione di eterorecettori accoppiati ai GIRK, quali ad esempio il recettore del GABA, $GABA_B$, induce inibizione neuronale e ridotto rilascio di dopamina nelle aree di proiezione.



Luscher & Slesinger, 2010

FIG. 7 Ruolo dei GIRK nella modulazione dell'attività neuronale

1.3 AMINE IN TRACCIA

1.3.1 Cenni generali

Le “amine in traccia” (TAs), (Usdin & Sandler, 1976; Baldessarini & Fischer, 1977) anche definite “microamine” (Boulton, 1976), “feniletilamine non-catecoliche” (Mosnaim & Wolf, 1980), o “falsi neurotrasmettitori” (Kopin et al., 1964), sono una classe di composti endogeni altamente correlati ai

neurotrasmettitori monoaminergici (adrenalina, serotonina e dopamina) dal punto di vista della struttura chimica, delle vie metaboliche di sintesi e catabolismo, della localizzazione cellulare e della distribuzione tissutale (Boulton & Quan, 1970; Boulton & Wu, 1972, 1973; Wu & Boulton, 1973; Grandy, 2007).

Tradizionalmente sono incluse in questo gruppo: la β -feniletilamina (β -PEA), la tiramina (TYR), l'octopamina (OA), la sinefrina (SYN) e la triptamina (TRP).

Da un punto di vista chimico si tratta di composti aminergici aromatici a basso peso molecolare, la cui struttura base prototipo è rappresentata da un anello aromatico unito a una piccola catena alifatica, la feniletilamina, la cui formula chimica è $C_8H_{11}N$.

Le amine in traccia sono presenti in molti, se non in tutti, gli organismi procarioti ed eucarioti. Per quanto riguarda il regno animale, evidenza di espressione endogena delle amine in traccia è stata documentata in tutte le specie di invertebrati e di vertebrati finora analizzate, compreso l'uomo (Philips et al., 1978; Berry, 2004; Grandy, 2007).

Inoltre le amine in traccia possono essere assunte anche attraverso la dieta in quanto numerosi generi alimentari ne contengono livelli non trascurabili, sia a causa dell'utilizzo di ingredienti vegetali o animali (come il cacao,) ricchi di TAs, sia perchè si tratta di alimenti soggetti a fermentazione batterica (vino, birra e formaggi).

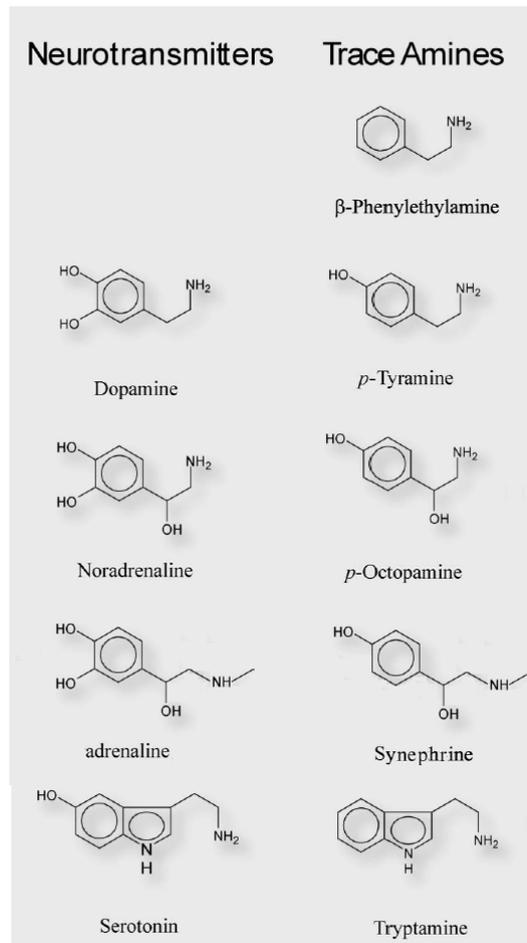


FIG. 8 Struttura chimica dei neurotrasmettitori monoaminergici e delle amine in traccia

1.3.2 Scoperta

L'isolamento e la successiva identificazione della β -PEA, risale ad oltre 100 anni fa, ed in particolare al 1876, quando il Prof. Nencki, un chimico fisiologo svizzero annunciò l'isolamento da gelatina in decomposizione di un aril

alchilamina avente la composizione chimica della β -PEA (Nencki, 1876; Grandy, 2007).

L'anno dopo dal suo allievo Jeanneret fu confermata la presenza dell'amina anche in uova in putrefazione (Jeanneret, 1877).

Nel 1879 Schulze e Barbieri dimostrarono che la β -PEA veniva prodotta dall'aminoacido L-fenilalanina mediante una decarbossilazione causata da batteri in condizioni anaerobiche. Evidenze ritrovate negli anni successivi e fino ai primi del 900 confermarono la presenza della β -PEA in materiale in decomposizione e in prodotti soggetti a fermentazione batterica quali birra, vino e formaggi, consolidando la convinzione che la β -PEA fosse solo un prodotto di scarto della fermentazione. Successivamente, in seguito al lavoro di due chimici, Barger e Walpole, e di un fisiologo, Dale, fu possibile dimostrare che in realtà la β -PEA possiede significativi effetti biologici. La prima evidenza a riguardo risale al 1906 quando Abelous e colleghi dimostrarono che composti organici estratti da carne di cavallo in putrefazione inducevano un forte innalzamento della pressione arteriosa. In seguito a questa osservazione Barger e Walpole isolarono ed identificarono la β -PEA e la tiramina dalla carne in decomposizione ed in collaborazione con il fisiologo Dale dimostrarono che proprio questi composti estratti erano responsabili dell'aumento della pressione arteriosa già osservato da Abelous (Barger & Walpole, 1909; Barger & Dale, 1910). Inoltre fu grazie al lavoro di Berger, Dale, Dixon, Clark e Walpole che fu definitivamente stabilito che la β -PEA e la tiramina erano i costituenti e i

responsabili degli effetti “adrenalina-simili” delle preparazioni a base di estratti del fungo ergot usate da lungo tempo in ostetricia per le proprietà di induzione delle contrazioni uterine (Barger & Dale, 1909; Clark, 1911). Pertanto le amine β -PEA e tiramina furono classificate come composti naturali con potenti effetti simpaticomimetici (Dale & Dixon, 1909; Barger & Dale, 1910).

1.3.3 Biosintesi e catabolismo

Le amine in traccia endogene vengono sintetizzate mediante decarbossilazione enzimatica a partire dagli aminoacidi tirosina, fenilalanina e triptofano ad opera della decarbossilasi degli aminoacidi aromatici (L-AADC; EC 4.1.1.28). In particolare tiramina, β -feniletilamina e triptamina derivano direttamente da tirosina, fenilalanina e triptofano, rispettivamente, mentre l’octopamina viene prodotta dalla tiramina (Brandau & Axelrod, 1972) dall’enzima dopamina- β -idrossilasi (DBH) e la sinefrina deriva dall’octopamina mediante metilazione ad opera dell’enzima feniletanolamina-N-metiltransferasi (Axelrod & Saavedra, 1977).

La via biosintetica delle amine in traccia è strettamente correlata a quella dei neurotrasmettitori aminergici (noradrenalina, serotonina e dopamina). Infatti entrambe le classi di amine derivano dagli stessi aminoacidi aromatici e l’enzima AADC, direttamente implicato nella sintesi delle TAs, è anche responsabile della conversione del 5-idrossitriptofano in serotonina e della L-Dopa in dopamina, la quale successivamente viene trasformata in adrenalina.

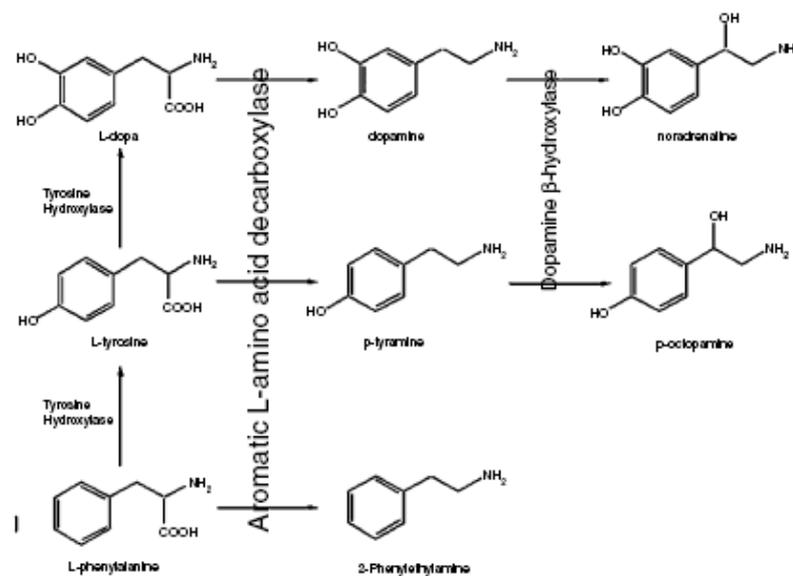
L'enzima AADC è distribuito diffusamente nel sistema nervoso centrale (SNC) ed è localizzato nei neuroni che costituiscono i sistemi dopaminergico, noradrenergico e serotoninergico sebbene una popolazione neuronale distinta ("cellule D"), immunopositiva per l'AADC ma immunonegativa per la tirosina idrossilasi, la triptofano idrossilasi e la serotonina è stata descritta (Jaeger et al., 1984; Kitahama et al., 1990). Il significato funzionale delle "cellule D" nel SNC non è stato ancora chiarito; considerato che si tratta di neuroni che mancano del corredo enzimatico necessario per la produzione di dopamina, serotonina e noradrenalina ma potenzialmente possono sintetizzare le amine in traccia, alcuni ricercatori hanno ipotizzato che potrebbero costituire una popolazione neuronale che utilizza specificatamente le amine in traccia come molecole neurotrasmettitoriali (Berry et al., 2007).

Le amine in traccia possono essere sintetizzate, a livello periferico, nel tratto gastrointestinale per opera dell'AADC batterica a partire dagli aminoacidi assunti con la dieta (Jansen et al., 2003).

L'attività enzimatica dell'AADC è altamente regolata, sia da stimoli sensoriali (quali la luce nella retina, Hadjiconstantinou et al., 1988) che in risposta all'attivazione dei recettori noradrenergici e dopaminergici (Berry, 2007). Evidenze sperimentali dimostrano che l'inibizione farmacologica dei recettori dopaminergici D1 e D2 induce un aumento dell'attività enzimatica (Hadjiconstantinou et al., 1993; Zhu et al., 1992; Cho et al., 1997) mentre

agonisti dei recettori D1 provocano inibizione enzimatica (Hadjiconstantinou et al., 1993; Zhu et al., 1994; Cho et al., 1997).

E' stato documentato che alterazioni dell'attività dell'AADC si riflettono su modificazioni dei livelli delle amine in traccia: antagonisti dei recettori dopaminergici, attivando l'AADC, producono un aumento dei livelli striatali di β -PEA (Jurio et al., 1991) e triptamina (Jurio, 1982) nonché un'aumentata sensibilità agli effetti comportamentali della β -PEA (Stoff et al., 1984).



Berry, 2004

FIG. 9 Vie biosintetiche delle amine in traccia

L'attività enzimatica dell'AADC può essere regolata farmacologicamente da inibitori quali la carbidopa, la benserazide e la metildopa che rappresentano molecole attualmente utilizzate, in associazione con altri farmaci, nella terapia del morbo di Parkinson.

Le amine in traccia vengono metabolizzate principalmente dall'enzima monoamminossidasi (MAO; EC 1.4.3.4) mediante una deaminazione ossidativa, similmente ai neurotrasmettitori monoaminergici. Esistono due isoforme di tale enzima: MAO_A e MAO_B che presentano una differente selettività per il substrato. In particolare la β -feniletilamina costituisce il substrato selettivo prototipo dell'isoforma MAO_B (Yang & Neff, 1973) mentre le altre amine in traccia mostrano una minore selettività e sono metabolizzate da entrambe le isoforme (Philips & Boulton, 1979; Durden & Philips, 1980).

Un'ulteriore via metabolica delle amine in traccia è rappresentata in vivo dalla N-metilazione effettuata dall'enzima feniletanolamina-N-metiltransferasi (FNMT; EC 2.1.1.28) e da N-metiltrasferasi non selettive (NMT; EC 2.1.1.49) (Saavedra et al., 1973, 1974). Altri enzimi potenzialmente deputati al metabolismo delle amine in traccia sono le aminossidasi sensibili alla semicarbazide (SSAO), un gruppo di enzimi che catalizza la deaminazione ossidativa di aminoacidi aromatici ed alifatici in maniera simile alle MAO ma la cui attività non è inibita dai classici inibitori delle MAO ma dalla semicarbazide (Lyles, 1994; Magyar et al., 2001).

1.3.4 Localizzazione cerebrale

Le amine in traccia sono distribuite eterogeneamente nel SNC di mammifero e in numerosi tessuti periferici, tra cui la ghiandola salivare, il cuore e il rene (Berry, 2004). Per quanto concerne il SNC di ratto, le aree più ricche di β -PEA sono il tubercolo olfattorio, il globo pallido, il nucleus accumbens e i nuclei caudato-putamen (Paterson, 1990). La tiramina e la triptamina sono invece maggiormente presenti nei nuclei caudato-putamen, nel cervelletto ed in regioni corticali mentre i livelli più alti di espressione dell'octopamina si registrano nell'ipotalamo e nel cervelletto (Berry, 2008).

I livelli di espressione delle TAs nel cervello di mammifero (circa 1-5 ng/g di tessuto cerebrale) sono almeno due ordini di grandezza inferiori rispetto a quelli delle monoamine dopamina, serotonina e noradrenalina (300-600 ng/g) e proprio per tale ragione ci si riferisce a tali composti con il termine di “amine in traccia” (Usdin & Sandler, 1976). Ciononostante la velocità di sintesi delle TAs è paragonabile a quella dei neurotrasmettitori monoaminergici e probabilmente i livelli di espressione così bassi sono dovuti al loro rapido *turnover*, dal momento che possiedono un'emivita di circa 30 secondi (Durden & Philips, 1980).

Sebbene la localizzazione sinaptosomiale delle amine in traccia sia stata documentata (Baldessarini & Vogt, 1972; Boulton & Baker, 1975), attualmente le evidenze sperimentali relative a specifici meccanismi di accumulo delle TAs

in vescicole sinaptiche sono discordanti e differiscono a seconda dell'amina implicata (Grandy, 2007). Evidenze contrarie all'accumulo vescicolare includono la mancanza di rilascio di β -PEA indotto da depolarizzazione neuronale ottenuta attraverso stimolazione elettrica o K^+ -dipendente (Dyck, 1988; Henry et al., 1988) e dalla reserpina (Boulton et al., 1977; Juorio et al., 1988) mentre altri gruppi hanno dimostrato rilascio vescicolare di β -PEA (Niddam et al., 1985; Kosa et al., 2000), di triptamina (Snodgrass & Iverson, 1974) e di tiramina (Dyck, 1982).

Considerata la natura altamente lipofila delle amine in traccia ed in particolare della β -PEA è anche verosimile che le TAs vengano “rilasciate” dalle terminazioni nervose attraverso semplice diffusione attraverso la membrana plasmatica e che di conseguenza i livelli cerebrali riscontrati riflettano l'equilibrio esistente tra sintesi e degradazione (Berry, 2008).

1.3.5 Effetti biologici delle TAs

Nonostante la localizzazione cerebrale delle TAs sia stata ben caratterizzata, il ruolo fisiologico svolto da tali amine nel cervello di mammifero non è stato ancora del tutto chiarito. Diversamente numerose evidenze sperimentali hanno confermato che negli invertebrati le amine in traccia rivestono il ruolo di neurotrasmettitori e sono implicate nel controllo d'importanti funzioni vitali, quali il movimento, il comportamento associato all'assunzione di cibo e l'apprendimento (Sotnikova et al., 2004; Roeder, 2005).

In una review recente sull'argomento, Burchett e Hicks (2006), in considerazione della letteratura esistente, hanno individuato 4 possibili ruoli svolti dalle TAs nel cervello di mammifero:

- *co-trasmettitori* rilasciati insieme a dopamina, serotonina e noradrenalina;
- *neurotrasmettitori* indipendenti, in grado di attivare specifici recettori per le amine in traccia recentemente identificati;
- "*falsi*" *neurotrasmettitori*, in grado di attivare, sebbene con minore potenza, i recettori dopaminergici e serotoninergici;
- *neuromodulatori*, per la loro capacità di regolare la sensibilità dei neuroni all'azione di altri neurotrasmettitori senza però possedere azioni dirette.

In generale le risposte indotte dalle TAs possono essere classificate in dirette o indirette, a seconda se agiscono indipendentemente o meno dai classici neurotrasmettitori monoaminergici.

1.3.5.1 Effetti indiretti

Gli effetti indiretti delle TAs sono ascrivibili alla loro capacità di indurre il rilascio dei neurotrasmettitori monoaminergici nello spazio extracellulare. Il meccanismo di rilascio, che prevede lo spiazzamento del neurotrasmettitore dalle vescicole sinaptiche oltre che l'inversione del trasportatore di membrana, è simile a quello dell'amfetamina e, in considerazione della forte omologia nella

struttura chimica, è stato proposto che la β -PEA possa rappresentare “un’amfetamina endogena” (Janssen, 1999).

Le amine in traccia sono state classificate in passato come falsi neurotrasmettitori, in quanto sostituendo le catecolamine nelle proprie vescicole sinaptiche ma presentando rispetto a queste una minore efficacia di attivazione dei recettori catecolaminergici, inducevano un indebolimento della trasmissione delle monoamine.

In relazione al sistema dopaminergico è stato dimostrato che le TAs sono in grado di indurre rilascio di dopamina da sinaptosomi (Raiteri et al., 1977) e in fettine striatali di ratto (Dyck, 1983). Inoltre da studi *in vivo* è emerso che la β -PEA stimola il rilascio di dopamina nello striato (Philips & Robson, 1983) e nel nucleus accumbens (Nakamura et al., 1998) di ratto ed induce rotazioni ipsilaterali in animali lesionati unilateralmente con 6-idrossidopamina (Barroso & Rodriguez, 1996). Inoltre studi elettrofisiologici hanno evidenziato che le amine in traccia iperpolarizzano i neuroni dopaminergici mesencefalici mediante un meccanismo indiretto dovuto al rilascio di dopamina e conseguente attivazione degli autorecettori D2 (Geracitano et al., 2004).

1.3.5.2 Effetti diretti

L’ipotesi che gli effetti biologici delle TAs non si limitassero esclusivamente a quelli di induzione del rilascio neurotrasmettitoriale già noti cominciò a delinearsi a partire dagli anni ’70 e quindi molto in anticipo rispetto alla

concreta dimostrazione dell'esistenza di recettori specifici per le TAs (Bunzow et al., 2001; Borowsky et al., 2001). In quegli anni Boulton (1976), durante una presentazione ad un congresso, suggerì che le amine in traccia potevano esercitare i loro effetti modulatori agendo *direttamente* o *indirettamente* sulla trasmissione sinaptica monoaminergica. Attraverso i loro effetti diretti, le TAs avrebbero modulato la sensibilità di alcuni parametri biofisici della membrana postsinaptica di neuroni che esprimevano recettori monoaminergici, probabilmente attraverso meccanismi ionotropici o metabotropici (Boulton, 1976). Negli stessi anni furono effettuati studi volti all'identificazione di specifici siti di legame delle TAs nel cervello di mammifero. Fu così dimostrata la presenza di siti di legame specifici ed ad alta affinità sia per la β -PEA (Hauger et al., 1982; Richard et al., 1982) che per la tiramina (Vaccari et al., 1986), la cui distribuzione ricalcava le aree cerebrali di maggiore espressione delle TAs (Burchett & Hicks, 2006).

L'evidenza più importante a conferma del fatto che le amine in traccia possano esercitare effetti diretti deriva dalla scoperta dell'esistenza di una famiglia di recettori associati a proteine G selettivamente attivati dalle amine in traccia (Bunzow et al., 2001; Borowsky et al., 2001). Oltre a questi, recentemente sono stati individuati altri potenziali target molecolari delle TAs tra cui i recettori sigma (Fontanilla et al., 2009) e, almeno negli invertebrati, recettori ionotropi associati a canali al Cl^- (Pirri et al., 2009; Ringstad et al., 2009).

Recettori associati alle amine in traccia

L'esistenza di recettori specifici per le TAs, ipotizzata in passato in seguito alla scoperta nel cervello di siti di legame ad alta affinità sia per la tiramina (Vaccari, 1986) che per la β -feniletilamina (Richard et al., 1982; Nyugen et al., 1989), è stata confermata solo recentemente grazie alla scoperta (Bunzow et al., 2001; Borowski et al., 2001) di una famiglia di recettori associati a proteine G attivati dalle TAs, i cosiddetti recettori associati alle amine in traccia (TAARs). La famiglia dei TAARs, comprende diversi sottotipi recettoriali dei quali solo due (TA₁ e TA₂) (Maguire et al., 2009) risultano sensibilmente attivati dalle TAs (Grandy et al., 2007). Tra i TAARs il TA₁ è stato più estensivamente studiato ed appare accoppiato a proteine G di tipo G_s, inducendo attivazione dell'adenilato ciclasi ed accumulo intracellulare di cAMP.

La distribuzione del recettore TA₁ nel SNC di mammifero è stata indagata per la prima volta da Borowsky e colleghi (2001), attraverso l'analisi dell'espressione dell'mRNA del recettore nel cervello umano e di topo. Altri gruppi hanno invece caratterizzato la distribuzione del recettore nel cervello di ratto (Bunzow et al., 2001) e di scimmie Rhesus (Xie et al., 2007). Da tali studi è emerso che il recettore TA₁ è distribuito diffusamente nel SNC, compreso in numerose regioni monoaminergiche quali il nucleo caudato dorsale e ventrale, il nucleo putamen, la sostanza nera, il nucleus accumbens, l'area tegmentale ventrale (VTA), il locus coeruleus, l'amigdala e il nucleo del Rafe (Xie et al., 2009). A livello cellulare, il TA₁ è localizzato principalmente nel citoplasma

dei corpi cellulari neuronali mentre l'espressione sulla membrana plasmatica è stata individuata solo occasionalmente (Xie et al., 2007).

In riferimento al sistema dopaminergico, è stato dimostrato che il TA₁ è espresso nei neuroni dopaminergici mesencefalici della SNpc e della VTA (Xie et al., 2007) e co-localizza con il trasportatore della dopamina (DAT) in un sottogruppo di neuroni della SNpc sia nel topo che nella scimmia (Xie et al., 2007), sebbene nella stessa area siano stati ritrovati neuroni che esprimono solamente il TA₁ o il DAT.

Il ruolo fisiologico svolto dal recettore TA₁ nell'ambito della modulazione dell'attività neuronale non è stato ancora del tutto chiarito. Numerose evidenze sperimentali recenti suggeriscono che il TA₁ agisce da neuromodulatore della trasmissione monoaminergica (Xie & Miller, 2009; Sotnikova et al., 2008; Lindemann et al., 2008; Bradaia et al., 2009; Wolinsky et al., 2007) regolando sia l'attività del trasportatore di membrana della dopamina (Xie et al., 2007, 2008; Xie & Miller, 2009) che l'attività elettrica dei neuroni dopaminergici della VTA (Lindemann et al., 2008; Bradaia et al., 2009). E' stata descritta un'interazione funzionale reciproca tra le TAs e la trasmissione dopaminergica in quanto l'attivazione degli autorecettori D2 sembra ridurre l'attivazione dei TA₁ (Xie et al., 2007) che contrariamente è aumentata dalla co-espressione del DAT con il TA₁ in cellule HEK293 (Miller et al., 2005). Inoltre sia il TA₁ che il D2 modulano l'attività del DAT, pur esercitando effetti opposti (Xie et al., 2008). Il TA₁ sembra mediare gli effetti

elettrofisiologici d'iperpolarizzazione neuronale prodotti dalle TAs nei neuroni dopaminergici mesencefalici (Bradaia et al., 2009; Lindemann et al., 2008), sia direttamente (Bradaia et al., 2009) che mediante un'azione regolatoria sul DAT (Lindemann et al., 2008).

Farmacologia

Il profilo farmacologico del recettore TA₁ appare estremamente interessante dal momento che sembra costituire il target molecolare di diverse classi di composti endogeni oltre che psicostimolanti amfetamino-simili (Borowsky et al., 2001; Xie & Miller, 2009a). In particolare, oltre alle TAs, il TA₁ è attivato dalle monoamine dopamina e serotonina (Borowsky et al., 2001) seppure da quest'ultima a concentrazioni micromolari e da una classe di amine endogene, le tironamine, derivanti dal metabolismo degli ormoni tiroidei (Zucchi et al., 2006; Hart et al., 2006). Inoltre da un punto di vista fisiologico è rilevante che composti derivanti dal metabolismo delle catecolamine, quali i derivati catecol-O-metossi prodotti dalle COMT, un tempo ritenuti metaboliti inattivi (Langer & Rubio, 1973; Seeman, 1980), risultano essere potenti agonisti del TA₁ (Bunzow et al., 2001). Composti psicostimolanti di sintesi appartenenti alla classe delle amfetamine, tra cui la metanfetamina e la metilen-diossi-metanfetamina (MDMA), che presentano notevole potenziale d'abuso, presentano una forte affinità per il recettore TA₁ (Borowsky et al., 2001). Recentemente, in seguito a studi su sinaptosomi striatali di topi normali e *knocked out* per il recettore TA₁ (TA₁ KO), Xie e Miller hanno proposto che il TA₁ possa costituire il recettore

cerebrale per le amfetamine in quanto è direttamente responsabile degli effetti di rilascio delle monoamine da queste indotte (Xie et al., 2007, 2008; Xie & Miller, 2009a,b).

Attualmente non sono disponibili in commercio antagonisti selettivi per il TA₁.

E' stato riportato un effetto inibitorio sul TA₁ alquanto modesto da parte di antagonisti non selettivi dei recettori delle monoamine (Wainscott et al., 2007).

Nuovi composti che mostrano un certo grado di antagonismo sul TA₁ sono stati sintetizzati recentemente (Tan et a., 2008; Bradaia et al., 2009) ma al momento non sono fruibili liberamente.

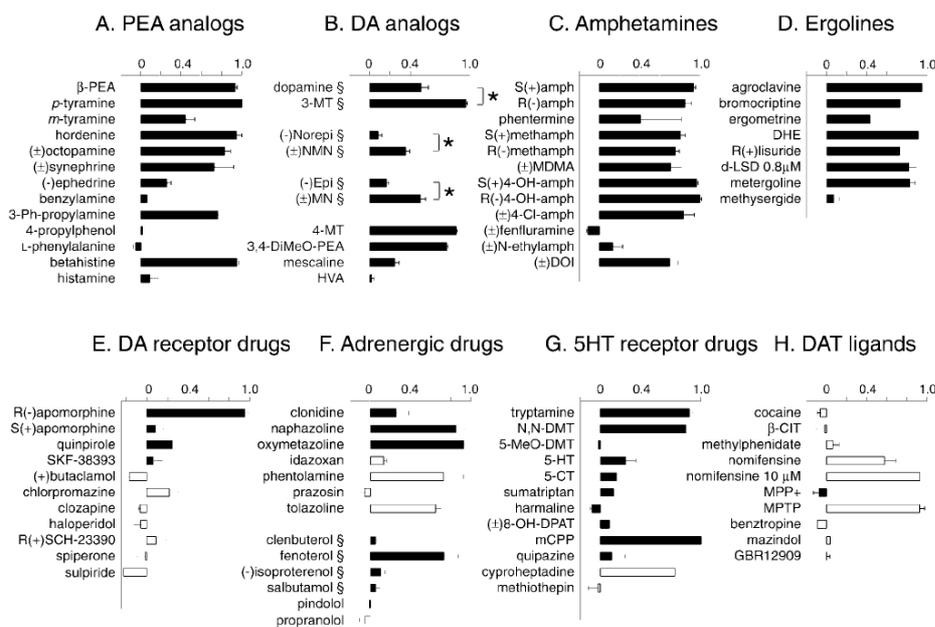


FIG. 10 Profilo farmacologico del TA₁. L'attivazione del recettore è stata valutata mediante la produzione di cAMP in cellule HEK293 che esprimevano il TA₁. Le barre indicano l'attività dei singoli composti (testati a 1 μM) come frazione del cAMP prodotto dalla p-tiramina (1 μM)

Recettori sigma

Evidenze recenti dimostrano che le amine in traccia, β -PEA e tiramina, sono in grado di attivare i recettori sigma (Fontanilla et al., 2009).

Sebbene inizialmente siano stati erroneamente classificati come un sottotipo dei recettori per gli oppioidi (Martin et al., 1976), attualmente è noto che i recettori sigma (σ) rappresentano una classe recettoriale distinta. Sono stati individuati due sottotipi recettoriali, σ_1 e σ_2 , che si differenziano sia da un punto di vista biochimico che per il profilo farmacologico (Hellewell & Bowen, 1990; Itzhak et al., 1991; Monnet & Maurice, 2006).

I recettori σ sono distribuiti diffusamente sia nel SNC che a livello periferico (Walker et al., 1990). Nel cervello sono maggiormente espressi nelle aree del sistema motorio e limbico (Gundlach et al., 1986) compresa la sostanza nera compacta (Bouchard & Quirion, 1997). Il ruolo fisiologico dei recettori σ nel cervello non è del tutto noto ma crescenti evidenze suggeriscono un potenziale coinvolgimento in numerose patologie tra cui la depressione, la dipendenza da cocaina e metamfetamina, il dolore, il morbo d'Alzheimer, l'ischemia cerebrale, l'infezione da HIV e il cancro (Maurice & Su, 2009).

I recettori σ_1 modulano l'attività di diverse classi di canali ionici voltaggio-dipendenti e canali aperti da ligando tra cui canali al Ca^{2+} , al K^+ , al Na^+ , al Cl^- , recettori NMDA e IP3 (Maurice & Su, 2009). Il meccanismo d'azione prevede un'interazione diretta proteina-proteina senza il coinvolgimento di proteine G e di protein chinasi (Lupardus et al., 2000; Aydar et al., 2002).

Il recettore σ_2 non è stato ancora clonato e sembra maggiormente coinvolto nella modulazione delle dinamiche del calcio intracellulare (REF) e nella regolazione del ciclo cellulare (Crawford et al., 2002; Gebreselassie & Bowen, 2004).

Recettori ionotropi

Evidenze sperimentali recenti suggeriscono che, oltre agli effetti mediati dai recettori TA₁ e quelli indiretti sul rilascio neurotrasmettitoriale, le TAs potrebbero influenzare l'attività neuronale agendo direttamente su recettori ionotropi. In particolare in *Caenorhabditis elegans* è stata riportata l'esistenza di un canale al Cl⁻ aperto dalla tiramina, la cui attivazione regola la locomozione del nematode (Pirri et al., 2009; Ringstad et al., 2009).

La presenza di recettori canali aperti dalle TAs nei mammiferi non è stata ancora accertata ma il loro ritrovamento negli invertebrati pone le basi per ipotizzare che le TAs possano modulare l'attività neuronale dei mammiferi anche attraverso eventi ionici rapidi (Branicky & Schafer, 2009).

1.3.6 Amine in traccia e disturbi neuropsichiatrici

Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che le amine in traccia sono coinvolte nella patogenesi ed eziologia di diversi disturbi neuropsichiatrici. In particolare un'alterazione della funzione e dei livelli ematici, urinari e cerebrali delle amine in traccia è stata riscontrata in disturbi neuropsichiatrici quali la

schizofrenia, il disturbo dell'attenzione ed iperattività (ADHD), la depressione, il morbo di Parkinson ed in disturbi metabolici caratterizzati da sintomi neurologici quali la fenilchetonuria (Branchet & Blackburn, 2003; Burchett & Hicks, 2006).

1.3.6.1 Depressione

L'ipotesi patogenetica più accreditata della depressione- la teoria monoaminergica- prevede che i disturbi depressivi siano causati da una riduzione dei livelli cerebrali dei neurotrasmettitori aminergici (Schildkraut, 1967; Lapin and Ovxenkrug, 1969). Tale teoria è avvalorata dal fatto che la maggior parte dei farmaci antidepressivi attualmente utilizzati agiscono al fine di ristabilire il tono catecolaminergico e di aumentare, mediante inibizione della ricaptazione del neurotrasmettitore o tramite inibizione dell'enzima MAO catabolizzante, i livelli extracellulari di noradrenalina, serotonina e dopamina.

Accanto alla teoria monoaminergica altre ipotesi sono state postulate per spiegare la patogenesi e l'eziologia della depressione. Una tra queste, la teoria della PEA, prevede il coinvolgimento delle amine in traccia ed in particolare della β -fenilettilamina. Secondo tale teoria la β -PEA endogena ha un effetto stabilizzatore sull'umore, sull'energia fisica e l'attenzione e per questo un deficit di tale amina o un aumentato catabolismo potrebbero essere dei fattori causali della depressione (Davis & Boulton, 1994; Branchet & Blackburn, 2003). Evidenze sperimentali che sostengono tale ipotesi comprendono

l'osservazione che i farmaci antidepressivi inibitori delle MAO producono un forte aumento dei livelli plasmatici della β -feniletilamina (Locock et al., 1984) oltre che delle catecolamine e che nei pazienti depressi i livelli ematici, cerebrali ed urinari delle amine in traccia risultano fortemente ridotti (De Lisi et al., 1984). Inoltre la somministrazione prolungata di β -PEA o del suo aminoacido precursore L-fenilalanina produce significativi miglioramenti dello stato affettivo di pazienti depressi (Sabelli et al., 1996).

1.3.6.2 Schizofrenia

La β -PEA sembra implicata anche nella neuropatologia della schizofrenia (Sandler and Reynolds, 1976; O'Reilly and Davis, 1994).

L'evidenza principale del coinvolgimento della β -PEA nella schizofrenia deriva dall'osservazione che i livelli plasmatici (Potkin et al., 1979; Shirkande et al., 1995) ed urinari (Yoshimoto et al., 1987; Myojin et al., 1989) di tale amina sono aumentati nei pazienti schizofrenici rispetto ai controlli. Inoltre la somministrazione di alte dosi di β -PEA a ratti e scimmie induce aumento dell'attività locomotoria e comportamenti stereotipati paragonabili agli episodi tipici della schizofrenia (Tinklenberg et al., 1978; Dourish, 1985). Inoltre, è stata riscontrata una correlazione tra schizofrenia e un polimorfismo del cromosoma 6 che contiene sequenze geniche relative ai recettori per le amine in traccia recentemente identificati (Burchett & Hicks, 2006). Tuttavia sono

necessari ulteriori studi per confermare il ruolo di mutazioni dei recettori per le amine in traccia come fattore di suscettibilità per la schizofrenia (Berry, 2008).

1.3.6.3 Disturbo dell'attenzione ed iperattività (ADHD)

Studi clinici hanno dimostrato l'esistenza di un legame tra la β -PEA e il disturbo dell'attenzione ed iperattività (ADHD). In particolare da uno studio recente su 26 bambini affetti da ADHD è emerso che i livelli plasmatici ed urinari della β -PEA e del suo metabolita principale l'acido fenilacetico risultavano significativamente ridotti nei pazienti affetti da ADHD rispetto agli individui normali (Baker et al., 1991). Lo stesso risultato è stato ottenuto in un altro studio clinico nel quale i livelli delle amine in traccia e dei principali metaboliti sono stati valutati in due gruppi di bambini, un gruppo di bambini affetti da ADHD e un altro gruppo di bambini autistici (Kusaga, 2002), suggerendo che un'alterazione dei livelli delle amine in traccia possa costituire un elemento comune nella fisiopatologia dell'ADHD e dell'autismo (Brancet & Blackburn, 2003).

1.3.6.4 Emicrania

Il coinvolgimento delle amine in traccia nella patogenesi dell'emicrania è tanto remoto quanto controverso. Tradizionalmente il consumo di cibi ricchi di TAs, quali cioccolato, formaggi, vino birra, carne è stato ritenuto un fattore scatenante attacchi di emicrania (Usdin & Sandler, 1976; Vaughan, 1994).

Tuttavia diversi studi clinici non hanno dimostrato ad oggi un legame diretto tra esposizione alle TAs ed emicrania (Branchek & Blackburn, 2003; D'Andrea et al., 2004) e pertanto il ruolo delle TAs in tale patologia non è del tutto chiaro.

1.3.6.5 Morbo di Parkinson

L'inibitore selettivo delle MAO_B, selegilina, rappresenta da lungo tempo un farmaco di scelta nella terapia del morbo di Parkinson. L'osservazione che la somministrazione di tale farmaco induce un forte aumento dei livelli plasmatici di β -PEA oltre a un miglioramento della trasmissione dopaminergica ha suggerito l'ipotesi di un potenziale coinvolgimento delle amine in traccia nella fisiopatologia del morbo di Parkinson (Wyatt, 1978; Branchek & Blackburn, 2003).

A conferma di tale ipotesi è stato notato che nei pazienti parkinsoniani i livelli plasmatici (D'Andrea et al., 2010) ed urinari (Heller & Fisher 1973) delle amine in traccia risultano ridotti. Inoltre studi *in vivo* di microdialisi hanno dimostrato che la β -PEA induce un prolungato aumento dei livelli di dopamina extracellulare nello striato (Kuroki et al., 1990) per cui è stato suggerito un suo potenziale impiego nella terapia del Parkinson (Heller et al., 1976) per limitare l'insorgenza dei fenomeni on-off che si manifestano come effetti collaterali di terapie farmacologiche che producono un aumento fasico dei livelli di dopamina (Branchek & Blackburn, 2003). (assunzione di L-dopa)

2. SCOPO DELLA RICERCA

I neuroni dopaminergici mesencefalici controllano importanti funzioni quali l'attività locomotoria, l'apprendimento e la motivazione e risultano implicati in numerosi disturbi neuropsichiatrici tra cui la schizofrenia, il morbo di Parkinson, la depressione, le dipendenze e l'ADHD. Pertanto la comprensione dei meccanismi fisiologici che ne regolano l'attività può avere numerose e rilevanti implicazioni.

Numerose evidenze documentano l'espressione delle amine in traccia nel SNC di mammifero, con particolare riferimento al sistema dopaminergico mesencefalico. Tuttavia il ruolo fisiologico svolto da tali amine endogene nella modulazione dell'attività neuronale in quest'area non è stato ancora del tutto delucidato.

Pertanto lo scopo primario del presente lavoro è stato lo studio degli effetti esercitati dalle amine in traccia sulle risposte dopaminergiche conseguenti all'attivazione dei recettori D2, per mezzo di registrazioni elettrofisiologiche intracellulari di neuroni dopaminergici della SNpc. Inoltre sono stati indagati i meccanismi molecolari alla base degli effetti modulatori delle TAs al fine di identificare il bersaglio molecolare da queste attivato. In particolare, mediante strategie genetiche e farmacologiche, è stato valutato il coinvolgimento dei recettori TA₁ e sigma negli effetti indotti dalle TAs. Inoltre, attraverso l'utilizzo di sistemi di espressione eterologa, è stato studiato l'effetto diretto delle TAs sui canali GIRK e sui recettori D2.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Preparazione delle fettine mesencefaliche

L'effetto delle amine in traccia è stato studiato effettuando registrazioni elettrofisiologiche su neuroni dopaminergici della sostanza nera pars compacta (SNpc) utilizzando come preparato biologico fettine mesencefaliche di roditore. A tal fine sono stati utilizzati topi (di età compresa tra i 18 e i 25 giorni) C57BL6 wild-type e modificati geneticamente mancanti il recettore TA₁. I topi sono stati anestetizzati con cloralio idrato (iniezione intraperitoneale 400 mg/Kg) e sacrificati mediante decapitazione. Il cervello è stato in seguito prelevato dal cranio ed una porzione contenente il mesencefalo è stata isolata mediante esclusione della porzione superiore situata al di sopra del chiasma ottico e della porzione inferiore corrispondente al tronco encefalico. La porzione cerebrale contenente il mesencefalo è stata posizionata su un supporto di agar al fine di minimizzarne i movimenti durante la procedura di taglio ed è stata immersa nel fluido cerebrospinale artificiale (aCSF) mantenuto a 8-10 C°. Il fluido cerebrospinale artificiale composto da 126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 2.4 mM CaCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃ e 10 mM glucosio era continuamente saturato con una miscela gassosa composta da 95% O₂ e 5% CO₂ (pH 7.4). Le fettine orizzontali di mesencefalo ventrale contenenti la SNpc sono state tagliate mediante un vibratomo (Leica VT1000S, Leica Microsystems, Wetzlar, Germania) e successivamente sono state poste a

recuperare in fluido cerebrospinale artificiale a 33-34 °C per 45 minuti prima di essere trasferite nella cameretta di registrazione.

3.2 Registrazioni elettrofisiologiche intracellulari su fettina

L'attività elettrica dei neuroni dopaminergici è stata studiata utilizzando la tecnica di registrazione intracellulare con microelettrodo *sharp*, mediante l'inserimento di una micropipetta all'interno dei singoli neuroni, che permette di valutare le caratteristiche bioelettriche neuronali quali il potenziale (in modalità current-clamp) o le correnti che fluiscono attraverso la membrana (in modalità voltage-clamp).

Le fettine di mesencefalo contenenti la SN sono state poste in una cameretta di registrazione sotto continua perfusione di aCSF (flusso 2.5-3 mL/min) mantenuto alla temperatura di 33 °C e saturato con carbossigeno (95% O₂ e 5% CO₂). I neuroni dopaminergici sono stati individuati mediante un microscopio (Axioskop, Zeiss, Germany) collegato ad un sistema di visualizzazione (Namamatsu, Tokyo) per le caratteristiche morfologiche, quali la presenza di un corpo cellulare fusiforme di 15-30 µm di diametro e dendriti diffusi in senso rostro-caudale, e successivamente sono stati selezionati per le proprietà elettriche caratteristiche, quali la frequenza di scarica di potenziali d'azione ad una frequenza costante compresa tra 0.5-4 Hz, potenziali d'azione caratterizzati da un'evidente after-iperpolarizzazione (AHP), la presenza di corrente inward in

risposta a stimoli iperpolarizzanti (corrente I_h) e iperpolarizzazione in risposta all'applicazione di dopamina (Grace & Onn, 1989; Mercuri et al., 1995).

Le registrazioni elettrofisiologiche intracellulari sono state effettuate utilizzando elettrodi preparati con micropipette in vetro borosilicato mediante un puller orizzontale (Narishige) e riempiti con una soluzione di KCl 2M (resistenza 30-80 M Ω). I segnali elettrici sono stati ottenuti per mezzo di un amplificatore (Axoclamp-2A, Axon Instruments) in modalità single-electrode voltage clamp (SEVC), clampando i neuroni a -60 mV.

La tecnica del SEVC permette di misurare le correnti che fluiscono attraverso la membrana plasmatica e consiste nel bloccare il potenziale di membrana dei neuroni ad un valore prefissato e misurare le correnti positive o negative che devono essere fornite alla cellula affinché il potenziale venga mantenuto al valore prefissato (clampato). In tal modo si ha una misura indiretta delle correnti che fluiscono attraverso la membrana plasmatica neuronale. I segnali elettrici sono stati registrati ed analizzati utilizzando il software pClamp 9 (Axon Instrument).

Costruzione delle curve I/V

Ulteriori esperimenti sono stati fatti per indagare la specie ionica maggiormente responsabile delle correnti registrate. A tal fine sono state costruite curve corrente-voltaggio (I-V) dalle quali è stato possibile estrapolare il punto di inversione della corrente, indicativo dello ione implicato. Per costruire le curve corrente-voltaggio (I-V) le cellule sono state sottoposte ad un protocollo di steps

di voltaggio iperpolarizzanti e depolarizzanti della durata di 200-400 ms a partire dal potenziale di holding (-60 mV). In particolare sono stati applicati steps con incremento di 14-16 mV da -45mV a -130 mV e le correnti risultanti sono state utilizzate per costruire le curve I-V.

Studio del coinvolgimento delle proteine G

Il potenziale coinvolgimento delle proteine G nel meccanismo di modulazione delle correnti indotte dall'attivazione del recettore D2 ad opera delle TAs è stato valutato utilizzando il GPT γ S, che rappresenta un analogo non idrolizzabile del GTP e pertanto induce l'attivazione irreversibile delle proteine G e di conseguenza dei processi da esse dipendenti. A tal fine il GPT γ S, utilizzato alla concentrazione di 1mM (sciolto in KCl 2M), è stato inserito nei neuroni dopaminergici mediante la micropipetta di registrazione. Per garantire la completa diffusione del GPT γ S nei neuroni dopaminergici impalati si è atteso circa 30 minuti prima di verificare l'effetto indotto dalle TAs sulla corrente outward D2-attivata indotta dal quinpirolo.

Modulazione delle vie metaboliche

La modulazione del metabolismo delle TAs è stata ottenuta farmacologicamente utilizzando inibitori selettivi degli enzimi deputati alla sintesi ed al catabolismo delle TAs. In particolare il blocco del catabolismo è stato ottenuto utilizzando l'inibitore irreversibile dell'enzima MAO_B, selegilina. Le fettine di mesencefalo sono state incubate in aCSF (a 33.0 ± 0.5 C°) contenente selegilina (30-100 nM)

per circa un'ora e successivamente sono state trasferite nella cameretta di registrazione.

Al fine di ottenere un blocco della sintesi delle TAs è stata utilizzata la carbidopa, un inibitore selettivo dell'enzima AADC. Anche in questo caso l'inibizione enzimatica completa è stata ottenuta esponendo le fettine di mesencefalo ad una soluzione di aCSF contenente carbidopa (300 μ M) per oltre un'ora prima di effettuare le registrazioni elettrofisiologiche.

3.3 Topi TA₁ KO

Il potenziale coinvolgimento del recettore TA₁, nel meccanismo di modulazione delle correnti indotte dall'attivazione del recettore D2, operato dalle TAs, è stato studiato utilizzando topi geneticamente modificati *knocked out* per il recettore TA₁ (TA₁ KO). Dal momento che attualmente non esistono in commercio antagonisti del recettore TA₁, l'utilizzo di topi KO rappresenta l'unico mezzo utile per indagare gli effetti biologici dipendenti da tale sottotipo recettoriale. I topi sono stati generati su nostra richiesta dalla ditta GenOway (Lione, Francia) utilizzando la strategia convenzionale della β -lattamasi, già impiegata da altri (Lindemann et al., 2008). In particolare la sequenza genica codificante il recettore TA₁ è stata sostituita da un costrutto assemblato dai seguenti frammenti genomici, una sequenza codificante LacZ fusa a una sequenza di localizzazione nucleare, IRES, un frammento NEO e la sequenza codificante la Timidino Chinasi (Tk).

Il costrutto genico è stato trasfettato in cellule embrionali staminali (ES) 129SvPas e sono state ottenute chimere da blastocisti di topi C57BL6. L'efficacia della delezione genica è stata valutata effettuando l'esame istoenzimologico della β -galattosidasi su sezioni cerebrali sagittali (30 μ m) di topi TA₁ KO adulti e mediante PCR per quantificare i livelli di espressione del trascritto del TA₁ in regioni cerebrali definite, compresa la SNpc (Millan et al., 2008). Una volta identificati, i topi omozigoti TA₁ KO sono stati incrociati per 8 generazioni prima di essere utilizzati come knockout congeniti (De Groote et al., 2007; Millan et al., 2008) per le registrazioni elettrofisiologiche. I topi TA₁ KO adulti appaiono sani e non presentano un fenotipo particolare e pertanto sono indistinguibili dai C57BL6 wildtype.

3.4 Preparazione degli oociti di *Xenopus Laevis*

La valutazione di un eventuale effetto diretto esercitato dalle TAs sul GIRK è stata studiata mediante esperimenti di espressione eterologa del canale in oociti di rane *Xenopus laevis*, che rappresentano uno dei più diffusi sistemi per l'espressione e lo studio di proteine esogene (Miledi et al., 1982; Bianchi et al., 2006).

A tal fine le rane sono state anestetizzate utilizzando l'estere etilico dell'acido 3-aminobenzoico. Gli oociti, allo stadio di maturazione V-VI, sono stati isolati mediante procedura chirurgica e conservati a 16 C° nella soluzione ND96 (pH 7.2) avente la seguente composizione: NaCl 96 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 1 mM,

CaCl₂ 1.8 mM, HEPES 5 mM, gentamicina 50 mg/mL). L'espressione dei GIRK2 e dei recettori D2 è stata ottenuta iniettando i corrispettivi mRNAs (50 nL di entrambi) nel nucleo dell'ooocita mediante un microiniettore (Nanoject, Drummond, Broomall, PA, USA).

Il recettore D2 e le subunità GIRK2 sono state subclonate nel vettore di espressione nell'ooocita pBF che fornisce le regioni non tradotte 5' e 3' del gene della β-globina di *Xenopus*, al fine di aumentare l'efficienza di traslazione dei trascritti di mRNA eterologhi negli oociti. Gli mRNA sono stati sintetizzati in vitro utilizzando il kit SP6 mMMESSAGE mMACHINE (Ambion), che introduce una guanosina all'estremità 5' dell'mRNA in trascrizione al fine di aumentare l'efficienza di legame del trascritto al ribosoma e della traslazione. L'mRNA del GIRK2 (50 nL) e l'mRNA del recettore D2 (50 nL) sono stati iniettati nell'ooocita mediante un microiniettore (Nanoject, Drummond, Broomall, PA, USA).

3.5 Registrazioni elettrofisiologiche su oociti di *Xenopus*

Le correnti GIRK espresse negli oociti di *Xenopus* sono state studiate mediante la tecnica two-electrode voltage clamp (TEVC), che rappresenta la metodica elettrofisiologica maggiormente utilizzata per misurare correnti che fluiscono attraverso i canali espressi negli oociti di *Xenopus* (Stefani, 1998; Stuhmer, 1998).

Le registrazioni sono state effettuate 2-8 giorni dopo l'iniezione degli mRNAs su oociti mantenuti a 22°C. I segnali elettrici sono stati ottenuti mediante un amplificatore GeneClamp 500 (Axon instruments) collegato mediante un'interfaccia ITC-16 (Instrutech Corp., Port Washington, NY USA) ad un computer. I microelettrodi sono stati riempiti con KCl 3M (resistenza 0.1-0.5 MΩ). La soluzione standard utilizzata durante la registrazione è così composta: 90 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM HEPES (pH 7.4). Gli oociti sono stati clampati a -10 mV e le correnti GIRK sono state evocate applicando steps di voltaggio della durata di 2 s con un incremento di 10 mV da +50 a -120 mV. Le registrazioni sono state filtrate a 2 kHz e acquisite a 5 kHz con il software Pulse HEKA elektronik GmbH, Lambrecht, Germany). L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando i seguenti programmi: IGOR (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA), PulseFit (HEKA elektronik GmbH) and Kaleida-Graph (Synergy Software, Reading, PA, USA). Le correnti di fuga e capacitative sono state sottratte utilizzando un protocollo P/4.

3.6 Farmaci

Le sostanze chimiche sono state preparate in soluzioni concentrate e successivamente applicate alla concentrazione desiderata diluite nell' aCSF e perfuse sulla fettina cerebrale attraverso un sistema di rubinetti a tre vie. Il ricambio completo della soluzione nella cameretta di registrazione si otteneva dopo circa un minuto di perfusione. In alcuni esperimenti GTPγS è stato infuso

direttamente nel citosol mediante la micropipette di registrazione. Sono state utilizzate le seguenti sostanze: dopamina, β -feniletilamina, tiramina, d-amfetamina solfato, cocaina, S(-)-carbidopa, R(-)-selegilina, GTP γ S sale di tetralitio sono state ottenute da Sigma (Milan, Italy); Quinpirolo, SM-21 maleato, BD1047 diidrobromuro sono stati ordinati da Tocris Cookson Inc. (Bristol, UK). O-fenil-3-iodotiramina (O-PIT) è stata gentilmente fornita dal Prof. Mark Millan (Croissy sur Seine, France)

3.7 Analisi dei dati

I dati numerici sono stati espressi come media \pm errore standard della media (S.E.M.). Per paragonare i dati è stato utilizzato il “*t* Test di Student” per osservazioni accoppiate e disaccoppiate. Il livello minimo di significatività considerato è $P < 0.05$. Per calcolare la IC_{50} e la risposta massima le curve concentrazione-risposta sono state fittate con la seguente equazione logistica: $Y = a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$ dove a è l’effetto massimo, b l’effetto minimo, x la concentrazione della sostanza e x_0 la concentrazione che induce il 50% dell’effetto massimo osservato.

4. RISULTATI

4.1 Le TAs riducono le risposte attivate dal D2 sui neuroni dopaminergici

L'effetto delle TAs è stato studiato effettuando registrazioni intracellulari con microelettrodo di neuroni dopaminergici della SNpc di topo (n=92) in modalità voltage clamp.

Nei neuroni dopaminergici l'attivazione dei recettori D2 induce iperpolarizzazione di membrana associata a una corrente outward dovuta all'apertura dei GIRK, canali al K⁺ aperti da proteine G di tipo G_{i/o} (Lacey et al., 1987). Negli esperimenti effettuati è stato utilizzato il quinpirolo, agonista selettivo dei recettori D2, per ottenere attivazione massimale e costante dei GIRK ed è stato valutato il potenziale effetto modulatore esercitato dalle TAs sulla corrente outward attivata dal D2.

Le TAs, β -PEA e tiramina (TYR), riducono in maniera reversibile l'ampiezza della corrente outward (78.9 ± 3.6 pA) prodotta dalla perfusione prolungata di quinpirolo (300 nM, n=59). In particolare l'applicazione di β -PEA (10-300 μ M) o di TYR (30-300 μ M) per 4-7 minuti durante la perfusione continua di quinpirolo inibisce la corrente GIRK D2-attivata (Fig. 1A,D). L'effetto delle TAs si stabilizza dopo 3-5 min e reverte completamente dopo 8-15 min. E' riproducibile e dipende dalla concentrazione (Fig 1A, B, E). Il valore IC₅₀ per la β -PEA è 82.9 ± 9.6 μ M e l'effetto inibitorio massimo si ottiene alla

concentrazione di 300 μM ($84.2 \pm 8.3 \%$, $n=8$). Un effetto inibitorio simile a quello delle TAs è prodotto dalla d-amfetamina (30 μM ; Fig. 1C,F) ma non dalla cocaina, inibitore della ricaptazione della dopamina (10 μM ; Fig. 1D). In particolare la perfusione di d-amfetamina (30 μM , $n=7$) induce una riduzione del $41.2 \pm 2.1 \%$ delle correnti GIRK attivate dal D2 mentre la cocaina (10 μM , $n=4$) non produce alcuna modificazione di tale corrente ne è in grado di antagonizzare l'effetto prodotto dalle TAs (Fig 1D, F).

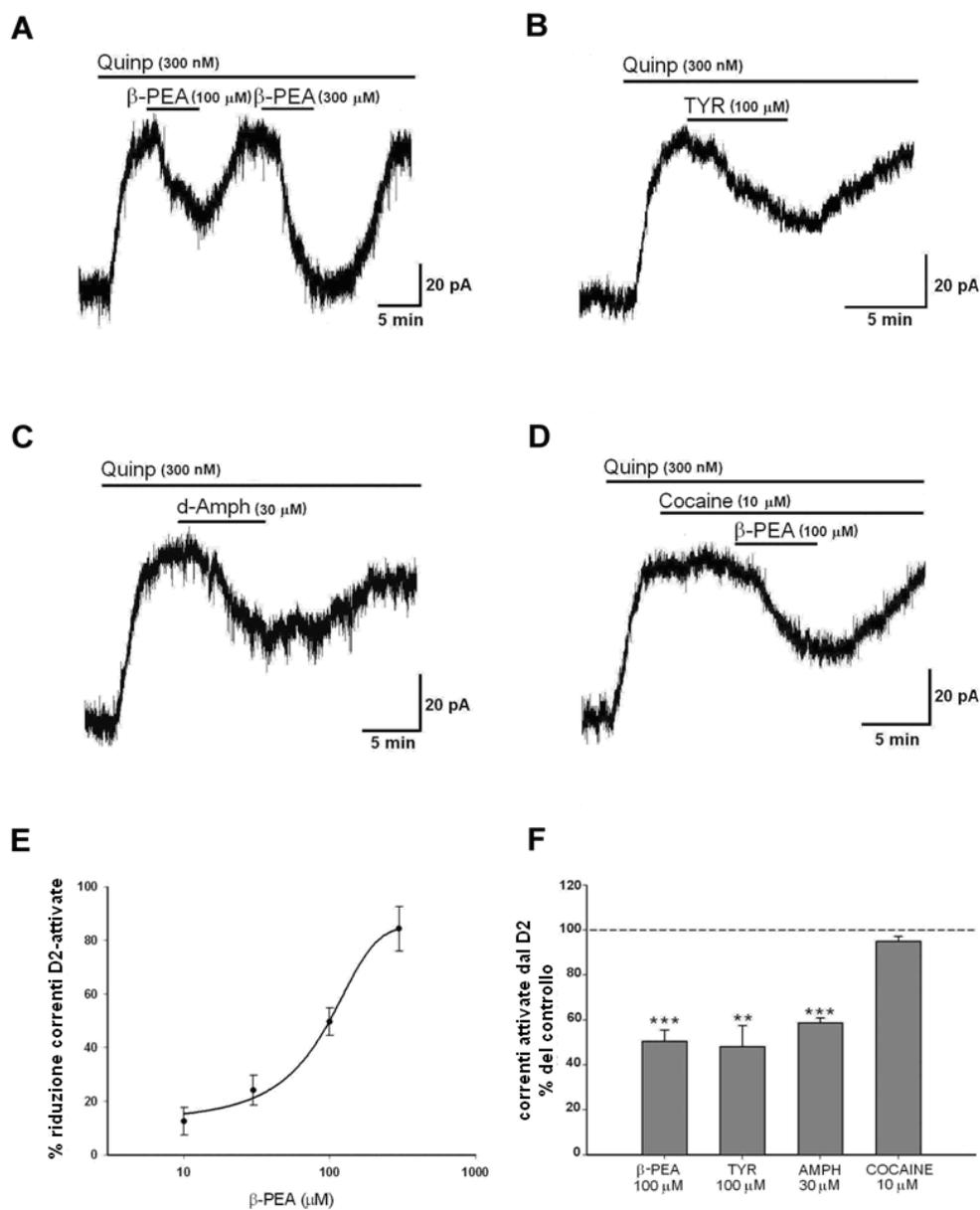


FIG. 1 Registrazioni rappresentative dell'effetto inibitorio della β -PEA (A) e della TYR (B) sulla corrente uscente (outward) indotta dal quinpirolo. Lo stesso effetto è prodotto dalla d-Amph (C) ma non dalla cocaina (D) che di nota non modifica la risposta della β -PEA. Il valore di IC₅₀ della β -PEA dalla curva concentrazione-risposta (E) è $82.9 \pm 9.6 \mu\text{M}$ ($n=6-8$ per concentrazione). L'istogramma in (F) indica la corrente normalizzata residua indotta dal quinpirolo (espressa come % del controllo) in presenza di β -PEA ($100 \mu\text{M}$, $n=17$, $p < 0.001$), tiramina ($100 \mu\text{M}$, $n=10$, $p < 0.005$), d-amph ($30 \mu\text{M}$, $n=7$, $p < 0.001$) e cocaina ($10 \mu\text{M}$, $n=4$, $p > 0.05$).

4.2 L'effetto delle TAs sulle correnti GIRK D2-attivate è modificato durante manipolazioni delle loro vie metaboliche

Successivamente è stato valutato se l'effetto delle TAs sulle correnti GIRK è influenzato da modificazioni delle vie metaboliche di sintesi e catabolismo, che producono alterazione dei loro livelli endogeni. In particolare sono state effettuate registrazioni in fettine mesencefaliche preincubate con selegilina, un inibitore irreversibile dell'enzima MAO_B, per ottenere riduzione del catabolismo delle TAs ed accumulo tissutale. Nelle fettine preincubate con selegilina (30-100 nM per 1 h) l'effetto inibitorio delle correnti GIRK indotto dalle TAs si osserva a concentrazioni più basse. La curva concentrazione-risposta della β -PEA è spostata a sinistra (Fig. 2A) e il valore di IC₅₀ è ridotto a $19.7 \pm 8.5 \mu\text{M}$ (n=7), indicando che l'inibizione del catabolismo delle TAs riduce le dosi efficaci.

L'inibizione della decarbossilasi degli aminoacidi aromatici (AADC), enzima implicato nella sintesi sia delle TAs che della DA, è stata ottenuta esponendo le fettine mesencefaliche ad un inibitore enzimatico selettivo, carbidopa (300 μM per circa 1 h).

Poiché in queste condizioni gli effetti indiretti delle TAs dovuti al rilascio di dopamina vengono aboliti (Geracitano et al., 2004) e i livelli endogeni delle TAs vengono ridotti, è possibile smascherare l'effetto totale delle TAs, applicate esogenamente, sulle correnti GIRK. Dagli esperimenti effettuati è emerso che nelle cellule trattate con carbidopa le TAs inibiscono le correnti

GIRK D2-attivate e la percentuale di riduzione è significativamente maggiore rispetto al controllo (Fig. 2B). In particolare la β -PEA (100 μ M) in carbidopa produce un'inibizione del 73.37 ± 10.47 % (n=7) mentre in controllo induce una riduzione del 49.52 ± 5.15 % (n=18; P<0.05).

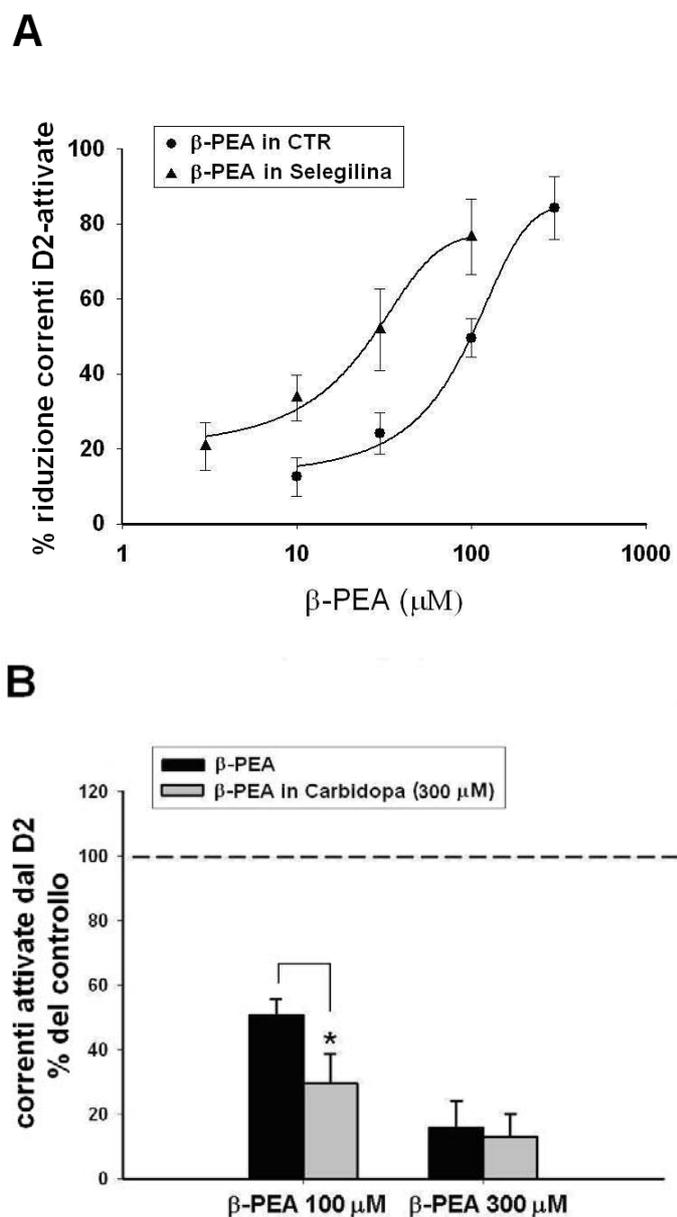


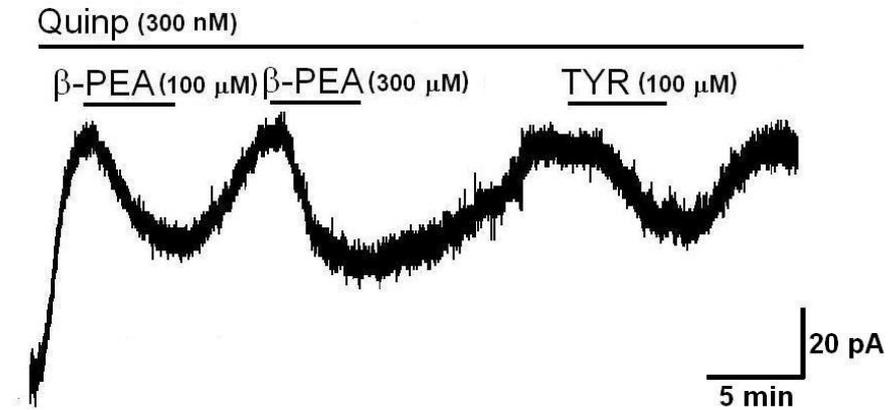
FIG. 2 Effetti della β -PEA in condizioni di inibizione enzimatica delle vie di biosintesi e catabolismo.

- (A) La riduzione del catabolismo delle TAs ottenuto mediante inibizione dell'enzima MAO_B con selegilina riduce le concentrazioni efficaci di β -PEA. In selegilina (100 nM per 1h) la curva concentrazione-risposta della β -PEA è spostata a sinistra rispetto alla curva controllo (n=7 per concentrazione).
- (B) L'inibitore dell'enzima AADC, carbidopa, aumenta l'effetto inibitorio di β -PEA (100 μ M, p<0.05) ma non modifica l'effetto osservato a dosi più alte (300 μ M) (n=7 esperimenti per concentrazione).

4.3 Il recettore TA₁ non è responsabile degli effetti modulatori delle TAs sulle correnti GIRK

L'effetto modulatorio delle TAs sulle correnti GIRK potrebbe essere dipendente dall'attivazione del recettore TA₁. Per studiare il potenziale coinvolgimento di tale recettore nell'inibizione delle correnti GIRK indotta dalle TAs sono state effettuate registrazioni intracellulari su fettine mesencefaliche di topi knockout per il TA₁ (TA₁ KO). I livelli cerebrali di espressione del TA₁ sono stati precedentemente quantificati (Millan et al., 2008) attraverso RT-PCR e Western Blotting e l'efficacia della transfezione genica è stata monitorata attraverso l'espressione della beta-lac. I recettori TA₁ risultano complessivamente assenti nella SNpc e in altre regioni cerebrali nei topi TA₁ KO rispetto ai topi controllo (Millan et al., 2008). Nei neuroni dopaminergici dei topi TA₁ KO sia la β -PEA che la TYR riducono la corrente outward attivata dal quinpirolo (Fig. 3A,a). L'effetto è paragonabile a quello osservato nei topi C57BL6 *wild type* sia per la cinetica che per le percentuali di inibizione ottenute (Fig. 3A,b). In particolare nei topi TA₁ KO β -PEA (100 μ M) e TYR (100 μ M) riducono la corrente indotta dal quinpirolo a 25.56 ± 9.83 % (n=7) ed a 56.6 ± 11.83 % (n=5) della corrente controllo rispettivamente mentre nei topi *wild type* concentrazioni corrispondenti inibiscono le correnti GIRK a 50.48 ± 5.15 % (n=17) ed a 48.15 ± 9.3 % (n=10) del controllo. Anche l'effetto modulatorio esercitato dalla d-AMPH persiste nei topi TA₁ KO con le stesse percentuali di inibizione osservate nei controlli.

A



B

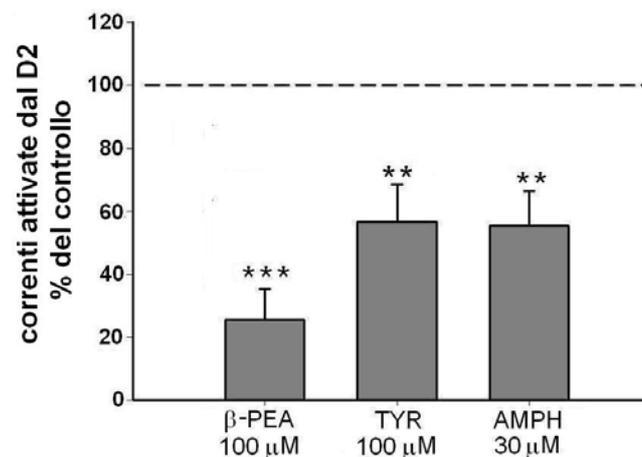


FIG. 3 Gli effetti delle TAS sulle correnti GIRK attivate dal D2 non sono mediati dall'attivazione del recettore TA₁.

(A) Registrazione rappresentativa dell'effetto inibitorio prodotto da β -PEA (100-300 μ M) and TYR (100 μ M) sulla corrente outward indotta dal quinpirolo in un neurone dopaminergico di un topo TA₁ KO.

(B) L'istogramma indica la corrente GIRK residua (% del controllo) registrata in presenza di β -PEA, TYR e d-Amph in neuroni DAergici di topi TA₁ KO.

Il coinvolgimento del recettore TA₁ nell'inibizione prodotta dalle TAs è stato valutato anche verificando se la perfusione di un agonista selettivo O-PIT (Hart et al., 2006) è in grado di mimare gli effetti indotti da tali composti endogeni. La perfusione di *O-PIT* (100 μM per 5 min, n=6) non riproduce la riduzione delle risposte D2-mediate prodotte dalle TAs (Fig. 3B). In particolare β-PEA (100 μM) induce una riduzione del $49.5 \pm 5,1$ % mentre *O-PIT* (100 μM) del $10,3 \pm 2,9$ % (Fig. 4).

I risultati ottenuti indicano pertanto che il recettore TA₁ non è coinvolto nell'effetto modulatorio esercitato dalle TAs sulle correnti GIRK.

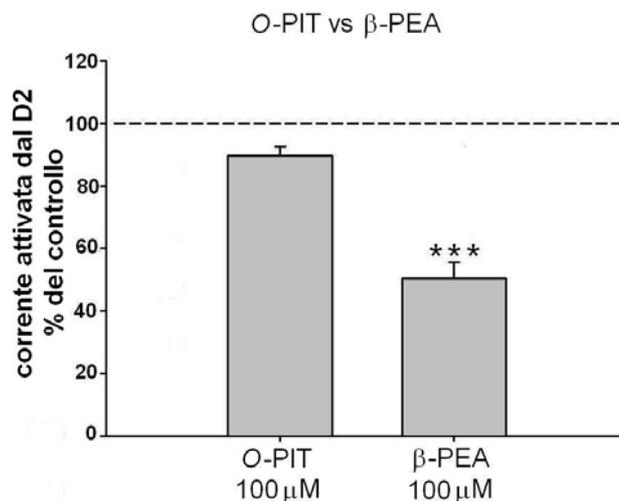


FIG. 4 L'agonista selettivo del recettore TA₁, O-PIT (100 μM), non riduce significativamente le correnti attivate dal quinpirolo (n=6, p>0.05) diversamente dalla β-PEA (p<0.001 *O-PIT* vs β-PEA) in neuroni DAergici di topi C57BL6 WT

4.4 Gli effetti delle TAs non sono dipendenti dall'attivazione dei recettori σ

Successivamente è stato valutato il coinvolgimento dei recettori sigma (σ -1 e σ -2) negli effetti inibitori delle TAs poiché recentemente è stato dimostrato che sia β -PEA che TYR legano entrambi i sottotipi recettoriali (Fontanilla et al., 2009) e l'attivazione degli stessi induce modulazione di diversi tipi di canali al K^+ e al Ca^{2+} (Lupardus et al., 2000; Aydar et al., 2002). Pertanto è stato verificato se il pretrattamento con antagonisti selettivi dei recettori σ -1 e σ -2 modifica l'effetto inibitorio della β -PEA. Gli esperimenti effettuati dimostrano che il pretrattamento con l'antagonista σ -2, SM-21 (30 μ M per 10 min) e l'antagonista σ -1, BD1047 (30 μ M per 10 min) non modifica la riduzione indotta dalla β -PEA (Fig. 5) delle correnti GIRK attivate dal quinpirolo (n=4 , 46.3 ± 6.1 % in presenza degli antagonisti *vs* 49.5 ± 5.1 % in controllo, $P > 0.05$).

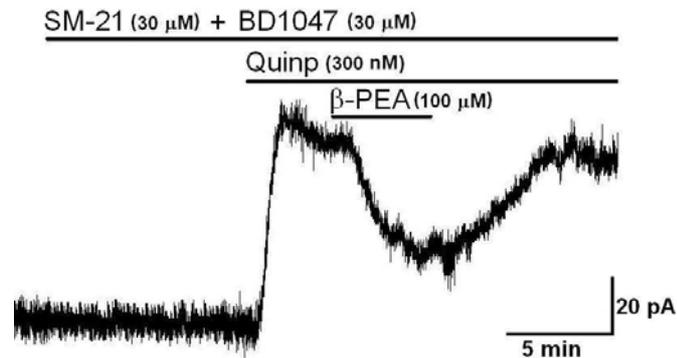


FIG. 5 I recettori σ non sono coinvolti nell'effetto modulatorio esercitato della β -PEA sulle correnti GIRK attivate dal D2.

La registrazione rappresentativa mostra che il pretrattamento con l'antagonista σ -2, SM-21 (30 μ M) e l'antagonista σ -1, BD1047 (30 μ M), non modifica l'effetto depressivo indotto dalla β -PEA sulla corrente GIRK D2-attivata.

4.5 Le TAs modulano negativamente le correnti GIRK

Per determinare la composizione ionica della corrente indotta dalle TAs sono state costruite le curve I-V sottoponendo i neuroni dopaminergici (clampati a -60 mV) ad un protocollo di steps di voltaggio iperpolarizzanti e depolarizzanti da -45 mV a -130 mV in condizioni di controllo, durante la perfusione di quinpirolo e durante l'applicazione contemporanea di β -PEA e quinpirolo. Il

grafico delle curve I-V (Fig. 4A) indica che il punto di intersezione delle correnti prodotte nelle tre condizioni sopra indicate (-101 mV), è corrispondente al potenziale di inversione del K^+ , confermando che le TAs modulano negativamente una conduttanza GIRK-mediata.

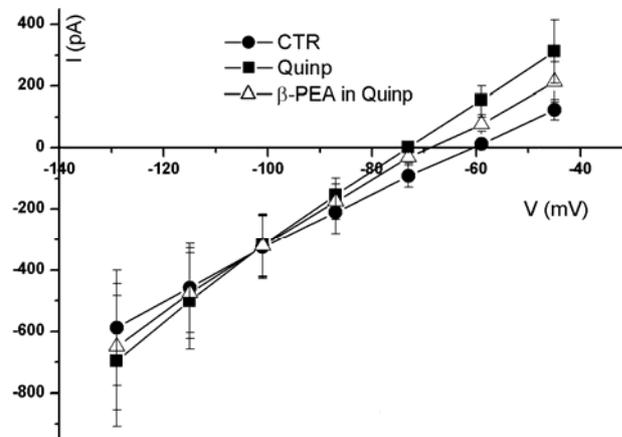


FIG. 6 Grafico delle curve I/V effettuate applicando steps di voltaggio in controllo (\bullet), in quinpirolo (\blacksquare) e in quinpirolo piú β -PEA (Δ) che indica che la corrente outward indotta dal quinpirolo e la corrente inward indotta dalla β -PEA revertano a -101 mV. Il punto di intersezione delle 3 curve è corrispondente al potenziale di inversione del K^+ . Ogni punto rappresenta la media \pm S.E.M. di 4 esperimenti.

4.6 Le TAs riducono le correnti GIRK attivate dal D2 attraverso un meccanismo indipendente dalle proteine G

Per caratterizzare ulteriormente il meccanismo alla base degli effetti inibitori delle TAs sulle correnti GIRK attivate dal D2 è stato valutato il potenziale coinvolgimento di meccanismi dipendenti da proteine G. A tal fine i neuroni dopaminergici sono stati caricati con un analogo non idrolizzabile del GTP, GTP γ S, per indurre un'attivazione irreversibile delle risposte proteina G-mediate. Nei neuroni dopaminergici la perfusione intracellulare di GTP γ S induce l'insorgenza spontanea di una corrente outward persistente dovuta alla progressiva e permanente attivazione delle proteine G_{i/o} (Lacey et al., 1987). In queste condizioni l'ulteriore stimolazione dei recettori D2 produce ulteriori risposte outward irreversibili fino alla completa attivazione dei GIRK. Dalle registrazioni effettuate è emerso che la perfusione intracellulare di GTP γ S (1 mM) e l'applicazione extracellulare di quinpirolo attivano una corrente outward media di 183 ± 32 pA (n=5) e la successiva applicazione di β -PEA (100 μ M) per 5 minuti induce una corrente inward di 95 ± 18 pA (n=5). È da notare che l'effetto indotto dalla β -PEA è reversibile e reverte completamente dopo 15 minuti (Fig. 7A) mentre altri eventi mediati da proteine G vengono attivati irreversibilmente nelle stesse condizioni (Fig. 7B). In particolare l'applicazione di un agonista dei recettori metabotropici del glutammato, DHPG (10 μ M), applicato in prossimità del picco della corrente outward indotta dal quinpirolo, induce una corrente inward irreversibile. Pertanto i risultati ottenuti escludono

un potenziale coinvolgimento di meccanismi dipendenti da proteine G nell'effetto inibitorio prodotto dalle TAs sulle correnti GIRK attivate dal D2.

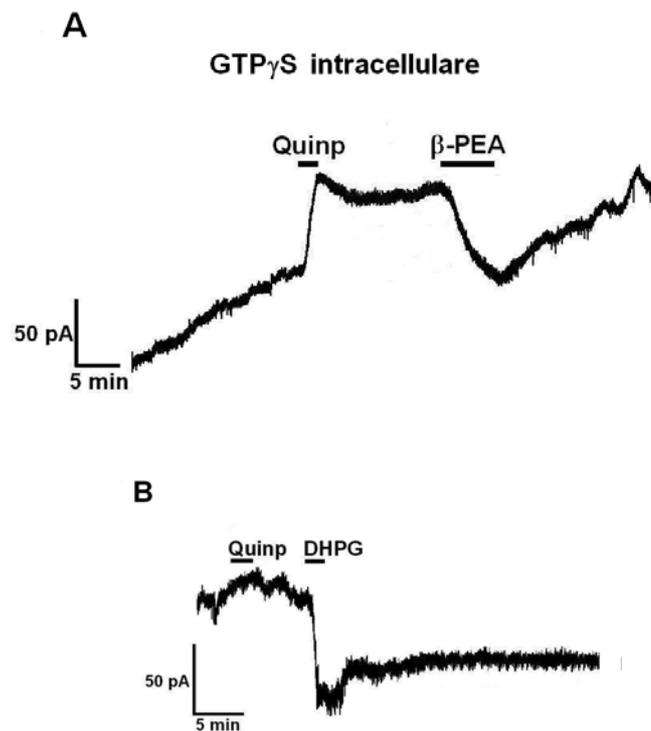


FIG. 7 Le TAs riducono le correnti GIRK D2-attivate attraverso un meccanismo indipendente dalle proteine G.

(A) Registrazione rappresentativa della corrente outward indotta dalla perfusione intracellulare di GTP γ S (1mM) in un neurone dopaminergico. La successiva applicazione di quinpirolo (300 nM) produce un'ulteriore corrente outward permanente che viene ridotta in maniera reversibile dalla β -PEA. E' da notare che mentre la corrente inward prodotta dalla β -PEA è reversibile quella indotta dall'agonista mGluR 1 DHPG (10 μ M) è permanente (B), indicando per il secondo il coinvolgimento di proteine G.

4.7 Le TAs non modificano le correnti GIRK espresse in oociti di *Xenopus*

Per determinare se l'effetto inibitorio esercitato dalle TAs sulle conduttanze GIRK attivate dal quinpirolo è dovuto ad un effetto diretto sul canale, l'RNA codificante i GIRK è stato iniettato in oociti di *Xenopus laevis* e le correnti risultanti sono state registrate in modalità TEVC. In oociti clampati a -10 mV, la β -PEA non influenza la corrente GIRK prodotta da uno step iperpolarizzante da -10 mV a -120 mV della durata di 2 secondi (Fig. 8A, C). In particolare la corrente GIRK in controllo è 580 ± 140 nA (n=12) mentre dopo l'applicazione di β -PEA (200 μ M per 5 minuti) è 610 ± 210 nA (n=12, P >0.05). Diversamente, l'applicazione di Ba^{2+} (200 μ M), un bloccante GIRK, produce rapidamente l'inibizione della corrente GIRK indotta (Fig. 8B, C).

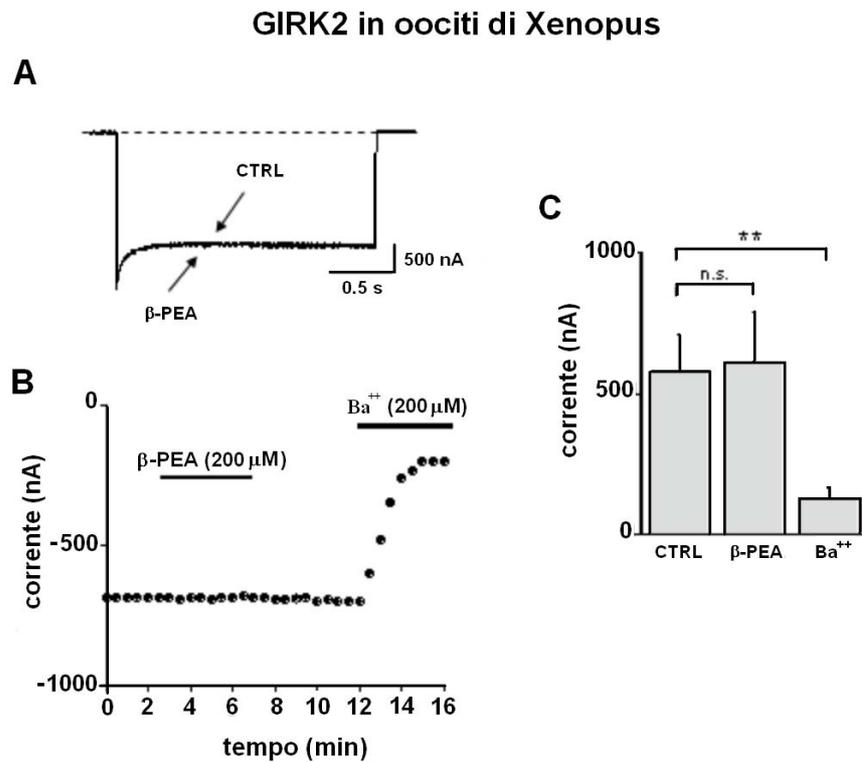


FIG. 8 Effetto della β -PEA sulla corrente basale di GIRK2 espressi in oociti di *Xenopus laevis*

(A) Corrente GIRK rappresentativa registrata da un oocita di *Xenopus* prima (CTRL) e dopo l'applicazione della β -PEA (200 μ M). Le correnti sono indotte applicando uno step di voltaggio iperpolarizzante da -10 mV a -120 mV per 2s. (B) *Time-course* dell'effetto della β -PEA (200 μ M) e del Ba^{2+} (200 μ M) sulla corrente GIRK basale. (C) L'istogramma indica l'ampiezza media delle correnti GIRK registrate a -120 mV prima (CTRL) e dopo l'applicazione di β -PEA e Ba^{2+} (n= 6-8 cellule per gruppo)

Successivamente il GIRK è stato co-espresso con il recettore D2 in oociti di *Xenopus*, per verificare se la β -PEA modula esclusivamente le correnti GIRK attivate dal D2. L'effetto della β -PEA è stato testato sulle correnti GIRK attivate dalla dopamina (Fig. 9D, E, F). Le correnti GIRK basali (1130 ± 300 nA, $n = 10$) vengono aumentate significativamente dall'applicazione di dopamina ($20 \mu\text{M}$; 1700 ± 300 nA, $n = 10$, $P < 0.001$) e in maniera reversibile (Werner *et al.*, 1996). La β -PEA ($200 \mu\text{M}$), non modifica in maniera significativa le correnti indotte dalla dopamina. In particolare dopo la perfusione di β -PEA per 5 minuti la corrente GIRK registrata è 1500 ± 320 nA ($n=10$).

Complessivamente i dati ottenuti dalle registrazioni sugli oociti di *Xenopus* indicano che l'effetto inibitorio della β -PEA sulle correnti GIRK non è dovuto ad un effetto diretto sul canale e che le TAs non interferiscono con l'attivazione del GIRK operata dal D2.

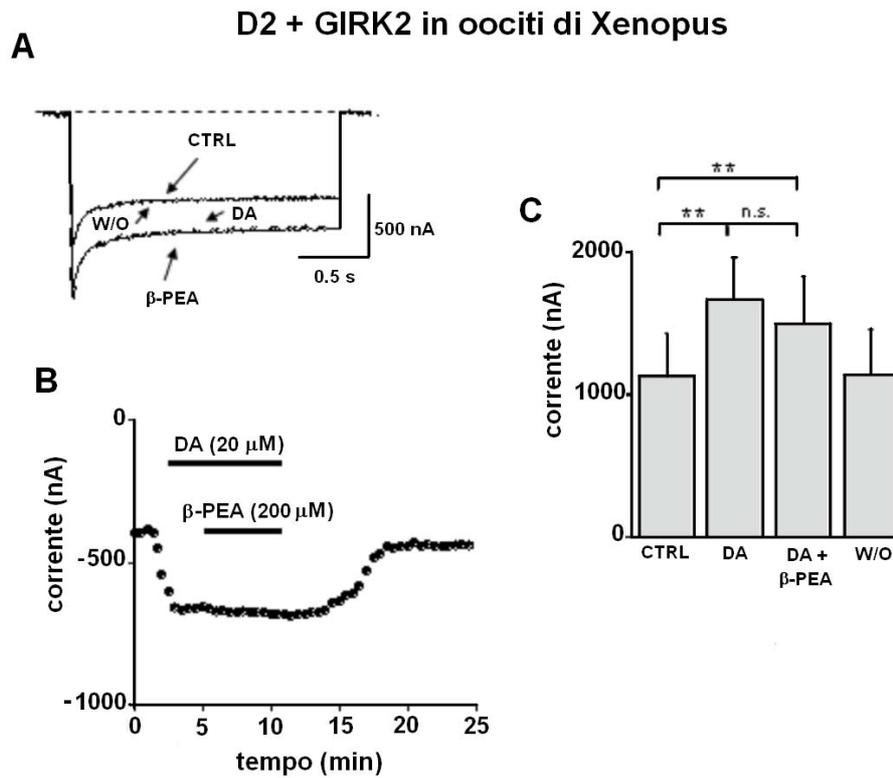


FIG. 9 Effetto della β -PEA sulla corrente GIRK indotta dalla DA in oociti di *Xenopus laevis* che coesprimono il GIRK2 e il recettore D2

(A) Registrazione rappresentativa della corrente GIRK basale espressa in un oocita di *Xenopus* (CTRL), della corrente evocata dalla DA ($20 \mu\text{M}$) e dell'effetto della β -PEA ($200 \mu\text{M}$).

(B) *Time-course* dell'effetto della DA e della β -PEA sulla corrente GIRK.

(C) L'istogramma indica l'ampiezza media delle correnti GIRK registrate a -120 mV in condizioni di controllo (CTRL), durante l'applicazione di DA, di β -PEA e dopo il wash-out della DA (W/O). ($n = 6-8$ cellule per gruppo).

5. DISCUSSIONE

I risultati riportati in questo studio dimostrano che le amine in traccia, β -PEA e TYR, riducono le correnti GIRK attivate dal recettore D2 in neuroni dopaminergici della SNpc. Il meccanismo alla base dell'effetto modulatore delle TAs non coinvolge l'attivazione del recettore TA₁ né dei recettori σ e risulta indipendente dall'attivazione delle proteine G.

Gli effetti inibitori delle TAs sulle correnti GIRK sono dipendenti dalla concentrazione; la maggior parte degli esperimenti sono stati effettuati con la β -PEA poichè rappresenta il prototipo della classe. La β -PEA esprime la sua azione con una IC₅₀ di circa 80 μ M. Sebbene tale concentrazione sia più alta di quella generalmente riscontrata negli studi su omogenati di tessuto cerebrale (Boulton, 1976; Berry, 2004; Grandy, 2007), può essere comunque considerata fisiologicamente rilevante dal momento che è verosimile che i livelli extracellulari di β -PEA presenti a livello sinaptico, siano in realtà almeno temporaneamente più alti di quelli riscontrati (Durden & Philips, 1980), considerato che la β -PEA possiede un turnover estremamente rapido, con un'emivita di soli 30s.

Inoltre bisogna considerare che, in studi *in vitro* su fettine cerebrali, la concentrazione di β -PEA che effettivamente raggiunge il sito d'azione è sicuramente inferiore rispetto a quella applicata esogenamente, sia per limiti di penetrazione della sostanza all'interno della fettina che per meccanismi di

degradazione. Un fenomeno analogo è stato dimostrato anche per la dopamina che influenza l'attività neuronale sono se perfusa a concentrazioni micromolari (Lacey et al., 1987; Suppes & Pinnock, 1987) e pertanto di gran lunga superiori a quelle presenti nei tessuti o nel fluido extracellulare.

Inoltre è anche da considerare che i livelli cerebrali delle TAs risultano modificati in diverse patologie neuropsichiatriche (Burchett & Hicks, 2006). Infatti un aumento dei livelli di β -PEA è stato riscontrato in condizioni patologiche quali la fenilchetonuria (Perry, 1962) o in soggetti depressi trattati con farmaci inibitori delle MAO_B (Grandy, 2007).

Gli esperimenti effettuati in questo studio dimostrano che la curva concentrazione-risposta della β -PEA è spostata verso destra in presenza dell'inibitore selettivo MAO_B, selegilina, indicando che l'attività dell'enzima catabolizzante, regolandone i livelli endogeni, influenza gli effetti delle TAs sui neuroni. Pertanto in determinate condizioni fisiopatologiche e in situazioni in cui l'attività della MAO_B è geneticamente o farmacologicamente ridotta, la disponibilità delle TAs può essere tale da influenzare significativamente l'attività neuronale.

L'inibizione enzimatica dell'AADC blocca la sintesi sia delle TAs che della dopamina e pertanto contrasta gli effetti indiretti delle TAs, dovuti al rilascio delle monoamine (Geracitano et al., 2004).

I risultati ottenuti nelle fettine esposte alla carbidopa dimostrano che gli effetti inibitori delle TAs sulle correnti GIRK attivate dal D2 non sono indirettamente

mediati dalla dopamina. In linea con questi risultati, altre evidenze sperimentali documentano effetti delle TAs indipendenti dalle monoamine. In particolare è stato dimostrato che l'iniezione intraventricolare di tiramina induce attività locomotoria in ratti pretrattati con reserpina o α -metil-tirosina al fine di escludere la possibilità di stimolazione recettoriale indiretta in seguito a rilascio di catecolamine (Stoof et al., 1976). Inoltre sono stati descritti altri effetti prodotti dalle TAs indipendentemente dall'azione della dopamina (Baud et al., 1985) e della noradrenalina (Paterson et al., 1993).

L'inibizione farmacologica dell'AADC comporta la riduzione dei livelli endogeni delle TAs e pertanto in queste condizioni è possibile accertare totalmente l'entità degli effetti prodotti dalle amine in traccia applicate esogenamente. Infatti in fettine esposte alla carbidopa l'applicazione di β -PEA (100 μ M) produce un'inibizione maggiore delle correnti GIRK rispetto al controllo.

I dati ottenuti dalle registrazioni elettrofisiologiche sui topi TA₁ KO, in cui è comunque possibile osservare l'effetto modulatore delle TAs, escludono il coinvolgimento del recettore TA₁ nel meccanismo di inibizione delle correnti GIRK. A conferma di ciò bisogna considerare che anche l'applicazione di un agonista TA₁ selettivo, O-PIT (Hart et al., 2006), non ha prodotto nei topi controllo la depressione delle correnti attivate dal D2 indotta dalla β -PEA.

Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che il recettore TA₁ svolge un ruolo modulatore della trasmissione dopaminergica in quanto regola l'attività

del DAT (Xie & Miller, 2009), influenza la desensitizzazione del D2 (Bradaia et al., 2009) e media l'iperpolarizzazione prodotta dalle TAs sui neuroni dopaminergici della VTA (Lindemann et al., 2008; Bradaia et al., 2009). Pertanto evidenze crescenti, ottenute da studi su topi TA₁ KO, suggeriscono che gli effetti neuromodulatori delle TAs sono dipendenti dall'attivazione dei TA₁ (Lindemann et al., 2008; Wolinsky et al., 2007; Xie & Miller, 2009; Sotnikova et al., 2008; Bradaia et al., 2009). I nostri dati diversamente indicano che le TAs possono modulare l'eccitabilità dei neuroni dopaminergici indipendentemente dall'attivazione del TA₁ complicando pertanto lo spettro d'azione già noto delle TAs.

Recentemente è stato dimostrato che le TAs hanno affinità per i recettori σ (Fontanilla et al., 2009). Numerose evidenze sperimentali indicano che i recettori σ inibiscono diverse classi di canali del K⁺ e dell Ca²⁺ attraverso un meccanismo di interazione diretta proteina-proteina, indipendentemente dall'attivazione delle proteine G (Lupardus et al., 2000). Inoltre è stato descritto un effetto inibitorio sulle correnti GIRK da parte di agonisti σ (Kobayashi *et al.*, 2006; Monassier *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 1998) sia nel cuore (Monassier *et al.*, 2007) che in neuroni catecolaminergici nel SNC (Nguyen *et al.*, 1998).

Pertanto abbiamo effettuato registrazioni elettrofisiologiche per valutare l'effetto delle TAs sulle correnti GIRK attivate dal D2 in presenza di antagonisti selettivi dei recettori σ_1 e σ_2 , BD1047 e SM-21 rispettivamente.

I dati ottenuti indicano che i recettori σ non sono coinvolti nel meccanismo alla base dell'effetto modulatore delle TAs sulle correnti GIRK attivate dal D2 nei neuroni dopaminergici della SNpc.

E' noto che la stimolazione dei recettori D2 attiva proteine $G_{i/o}$ che inducono l'apertura di canali GIRK. In accordo, anche nei nostri esperimenti il potenziale di inversione della corrente outward indotta dal quinpirolo è compatibile con un'apertura dei canali del K^+ . Inoltre la curva I-V effettuata in presenza di quinpirolo e β -PEA dimostra che anche la corrente ridotta dalla TA si inverte al potenziale di equilibrio del K^+ ed indica che la β -PEA inibisce una conduttanza GIRK-mediata.

Le registrazioni elettrofisiologiche in presenza del $GTP\gamma S$ ci hanno anche permesso di valutare il coinvolgimento delle proteine G nel meccanismo di inibizione delle correnti GIRK alla base dell'effetto delle TAs.

E' stato descritto un meccanismo di inibizione delle correnti GIRK da parte di recettori accoppiati a proteine $G_{q/11}$, i quali attraverso l'attivazione della fosfolipasi C (PLC), portano alla deplezione di fosfatidilinositolo-2,4-bisfosfato (PIP2) (Cho et al., 2005). PIP2 normalmente facilita l'apertura dei GIRK in quanto stabilizza il legame tra $\beta\gamma$ e il GIRK, responsabile dell'apertura del canale.

Tale meccanismo non è probabilmente alla base dell'effetto inibitorio delle TAs da noi riscontrato. Infatti dagli esperimenti effettuati con il $GTP\gamma S$ è emerso che le risposte dovute all'attivazione del recettore mGluR1 accoppiato a proteine

$G_{q/11}$ sono irreversibili mentre nella stessa cellula le TAs provocano un'inibizione reversibile delle correnti GIRK attivate dal D2.

Le correnti GIRK possono essere inibite anche in seguito all'azione di un gruppo di proteine, denominate RGS, che regolano la traduzione delle proteine G accelerandone l'attività GTPasica (Inanobe et al., 2001; Ishii et al., 2002; Abramow-Newerly et al., 2006) e pertanto influenzano negativamente l'accoppiamento tra GPCR e GIRK (Labouèbe et al., 2007). Tuttavia anche questo meccanismo non sembra coinvolto dell'effetto inibitorio delle TAs, considerato che il loro effetto persiste in presenza dell'analogo non idrolizzabile del GPT, il $GTP\gamma S$.

Inoltre, i risultati ottenuti dagli esperimenti effettuati sugli oociti di *Xenopus* dimostrano che le TAs non agiscono direttamente sul GIRK e non interferiscono con l'attivazione del GIRK operata dal D2. In base a questi esperimenti tuttavia non si può ancora escludere che le TAs modulino l'attività dei GIRK neuronali alterando l'efficienza di accoppiamento di $G\beta\gamma$ al canale, dal momento che la composizione delle subunità $\beta\gamma$ espresse negli oociti non è del tutto nota e potrebbe differire da quella presente nei neuroni dopaminergici della SNpc ed essere pertanto insensibile alle TAs.

Il meccanismo molecolare alla base degli effetti inibitori esercitati dalle TAs sulle correnti GIRK attivate dal D2 non è stato ancora del tutto delucidato. Le TAs riducono anche le correnti GIRK attivate dal recettore $GABA_B$ (Federici et al., 2005) e poiché lo stesso canale è attivato dal D2 e dal $GABA_B$ (Lacey et al.,

1988) probabilmente un meccanismo comune è coinvolto nella modulazione dei GIRK attivati dal D2 e dal GABA_B ad opera delle TAs.

Le TAs potrebbero alterare l'attività dei GIRK interferendo con il legame di $\beta\gamma$ al canale oppure regolando altri eventi a valle dell'attivazione del D2. Evidenze recenti dimostrano che il D2, oltre alle proteine G, interagisce con diverse proteine intracellulari chiamate complessivamente DRIPs (da "dopamine receptor interacting proteins") coinvolte, tra le altre cose, nella regolazione dell'accoppiamento del recettore agli effettori intracellulari. Le TAs potrebbero impedire l'interazione tra il recettore e le DRIPs e pertanto portare ad un'inibizione delle correnti GIRK attivate dal D2.

In conclusione il presente studio descrive un effetto modulatore negativo delle TAs sulle risposte attivate dall'autorecettore D2. I dati ottenuti pertanto indicano che gli effetti delle TAs non sono limitati alla modulazione del rilascio di catecolamine e rafforzano l'ipotesi che tali composti endogeni possano direttamente modulare la trasmissione dopaminergica.

Inoltre in relazione alle possibili implicazioni funzionali di tale studio è da notare che la modulazione negativa dell'attività degli autorecettori dopaminergici prodotta dalle TAs potrebbe contribuire a rendere i neuroni dopaminergici altamente eccitabili e di conseguenza avere importanti conseguenze non solo nel controllo del movimento e della motivazione ma anche in malattie neuropsichiatriche, quali il disordine dell'attenzione ed

iperattività, la schizofrenia e le discinesie, dove è stata postulata un'attivazione patologica dei recettori dopaminergici.

6. BIBLIOGRAFIA

Abramow-Newerly M, Roy AA, Nunn C, Chidiac P (2006). RGS proteins have a signalling complex: interaction between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins. *Cell Signalling* **18**: 579-591.

Aghajanian GK, Bunney BS (1973). Central dopaminergic neurons: neurophysiological identification and responses to drugs. In: Usdin E, Snyder SH, editors. *Frontiers in Catecholamine Research*. New York: Pergamon Press : 643–8.

Akaoka H, Charlety P, Saunier CF, Buda M, Chouvet G (1992). Inhibition of nigral dopamine neurons by systemic and local apomorphine: possible contribution of dendritic autoreceptors. *Neuroscience* **49**: 879– 891.

Ande'n NE, Carlsson A, Dahlstro'm A, Fuxe K, Hillarp N-A, Larsson K (1964). Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurones. *Life Sci* **3**: 523–30.

Ande'n NE, Dahlstro'm A, Fuxe K, Larsson K, Olson L, Ungerstedt U (1966). Ascending monoamine neurons to the telencephalon and diencephalon. *Life Sci* **4**: 1275–9.

Axelrod J, Saavedra JM (1977). Octopamine. *Nature* **265**: 501–504.

Baker G, Bornstein RA, Rouget AC, Schton SE, van Meyden JC, Coutts RT (1991). Phenylethylaminergic mechanism in attention-deficit disorder. *Biol Psychiatry* **29**: 15-22.

Baldessarini RJ, Fischer JE (1977). Substitute and alternative neurotransmitters in neuropsychiatric illness. *Arch Gen Psychiatry* **34**: 958–964.

Baldessarini RJ, Vogt M (1972). Regional release of aromatic amines from tissues of the rat brain in vitro. *J Neurochem* **19**: 755–761.

Barger G, Dale HH (1909). The water-soluble active principles of ergot. *J Physiol* **38**: 77–79.

Barger G, Dale HH (1910). Chemical structure and sympathomimetic action of amines. *J Physiol* **41**: 19–59.

Barger G, Walpole GS (1909). Isolation of the pressor principles of putrid meat. *J Physiol* **38**: 343–352.

Barroso N, Rodriguez M (1996). Action of b-phenylethylamine and related amines on nigrostriatal dopamine neurotransmission. *Eur J Pharmacol* **297**: 195–203.

Beninato M, Spencer RF (1987). A cholinergic projection to the rat substantia nigra from the pedunculopontine tegmental nucleus. *Brain Res* **412**: 169–74.

Berridge KC (2007). The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)* **191**: 391–431.

Berry MD (2007). The potential of trace amines and their receptors for treating neurological and psychiatric diseases. *Rev Recent Clin Trials* **2**:3-19.

Björklund A, Lindvall O (1984). Dopamine-containing systems in the CNS. In: 'Handbook of chemical neuroanatomy. Vol 2: Classical transmitters in the CNS, Part I.' (Eds: Björklund A. and Hökfelt, T.) Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 55–122.

Björklund A, Lindvall O (1975). Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons: suggestion for a role in dendritic terminals. *Brain Res* **83**: 531–537.

Bolam JP, Smith Y (1990). The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat. *Brain Res* **529**: 57–78.

Borowsky B, Adham N, Jones KA, Raddatz R, Artymyshyn R, Ogozalek KL *et al.* (2001). Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8966–8971.

Bouchard P, Quirion R (1997). [3H]1,3-di(2-tolyl)guanidine and [3H](+)pentazocine binding sites in the rat brain: autoradiographic visualization of the putative sigma1 and sigma2 receptor subtypes. *Neuroscience* **76**: 467–477.

Boulton AA (1976). Identification, distribution, metabolism and function of meta- and para-tyramine, phenylethylamine and tryptamine in brain. *Adv Biochem Psychopharmacol* **15**: 57–67.

Boulton AA, Baker GB (1975). The subcellular distribution of b-phenylethylamine, p-tyramine and tryptamine in rat brain. *J Neurochem* **25**: 477–481.

Boulton AA, Juorio AV, Phillips SR, Wu PH (1977). Effects of reserpine and 6-hydroxydopamine and the levels of some arylalkylamines in rat brain. *Br J Pharmacol* **59**: 209–214.

Boulton AA, Quan L (1970). Formation of p-tyramine from DOPA and DOPamine in rat brain. *Can J Biochem* **48**: 1287–1291.

Boulton AA, Wu PH (1972). Biosynthesis of cerebral phenolic amines: I. In vivo formation of p-tyramine, octopamine, and synephrine. *Can J Biochem* **50**: 261–267.

Boulton AA, Wu PH (1973). Biosynthesis of cerebral phenolic amines: II. In vivo regional formation of p-tyramine and octopamine from tyrosine and dopamine. *Can J Biochem* **51**: 428–435.

Bradaia A, Trube G, Stalder H, Norcross RD, Ozmen L, Wettstein JG *et al.* (2009). The selective antagonist EPPTB reveals TAAR1-mediated regulatory mechanisms in dopaminergic neurons of the mesolimbic system. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 20081–20086.

Branchek TA, Blackburn TP (2003). Trace amines receptors as target for novel therapeutics: legend, myth and fact. *Curr Opin Pharmacol* **3**: 90-97.

Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O (1988). Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* **336**:783-7.

Bunzow JR, Sonders MS, Arttamangkul S, Harrison LM, Zhang G, Quigley DI *et al.* (2001). Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. *Mol Pharmacol* **60**: 1181–1188.

Burchett SA, Hicks TP (2006). The mysterious trace amines: protean neuromodulators of synaptic transmission in mammalian brain. *Prog Neurobiol* **79**: 223-246.

Caron MG, Beaulieu M, Raymond V, Gagne B, Brouin J, Lefkowitz RJ, Labrie F (1978). Dopaminergic receptors in the anterior pituitary gland. *J Biol Chem* **253**: 2244-2253.

Cho H, Lee D, Lee SH, Ho WK (2005). Receptor-induced depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibits inwardly rectifying K⁺ channels in a receptor-specific manner. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 4643–4648.

Cho S, Neff NH, Hadjiconstantinou M (1997). Regulation of tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase by dopaminergic drugs. *Eur J Pharmacol* **323**: 149–157.

Clancy SM, Fowler CE, Finley M, Suen KF, Arrabit C, Berton F, Kosaza T, Casey PJ, Slesinger PA (2005). Pertussis-toxin-sensitive G α subunits selectively bind to C-terminal domain of neuronal GIRK channels: evidence for a heterotrimeric G-protein-channel complex. *Mol Cell Neurosci* **28**: 375–389

Clark A (1911). The clinical application of ergotamine (tyramine). *Biochem J* **5**: 236–242.

Crawford KW, Bowen WD (2002). Sigma-2 receptor agonists activate a novel apoptotic pathway and potentiate antineoplastic drugs in breast tumor cell lines. *Cancer Research* **62**: 313–322.

Dal Toso R, Sommer B, Ewart M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH (1989). The dopamine receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* **8**: 4025-4034.

D'Andrea G, Nordera G, Pizzolato G, Bolner A, Colavito D, Flaibani R, Leon A. (2010). Trace amine metabolism in Parkinson's disease: low circulating levels of octopamine in early disease stages. *Neurosci Lett* **469**: 348-51

Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M (1991). Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* **148**: 1474–1486.

DeLisi LE, Murphy DL, Karoum F, Mueller E, Targum S, Wyatt S (1984). Phenylethylamine excretion in depression. *Psychiatry Res* **13**: 193–201.

Di Chiara G (1995). The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alc Depend* **38**: 95–137.

Di Chiara G, Imperato A (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci* **85**: 5274–8.

Dourish CT (1985). Local application of b-phenylethylamine to the caudate nucleus of the rat elicits locomotor stimulation. *Pharmacol Biochem Behav* **22**: 159–162.

Dray A, Gonye TJ, Oakley NR, Tanner T (1976). Evidence for the existence of a raphe projection to the substantia nigra in rat. *Brain Res* **113**: 45–57.

Durden DA, Philips SR (1980). Kinetic measurements of the turnover rates of phenylethylamine and tryptamine in vivo in the rat brain. *J Neurochem* **34**: 1725-1732.

Dyck LE (1983). Release of monoamine from striatal slices by phenelzine and b-phenylethylamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **7**: 797–800.

Dyck LE (1988). Release of some endogenous trace amines from rat striatal slices in the presence and absence of a monoamine oxidase inhibitor. In AA. Boulton, A. V. Juorio, & R. G. H. Downer (Eds.), *Trace amines: comparative and clinical neurobiology*. New Jersey: Humana Press. (pp. 223–237).

Dyck LE, Juorio AV, Boulton AA (1982). The in vitro release of endogenous m-tyramine, p-tyramine and dopamine from the rat striatum. *Neurochem Res* **7**: 705–716.

Falkenburger BH, Barstow KL, Mintz IM (2001). Dendrodendritic inhibition through reversal of dopamine transport. *Science* **293**: 2465– 2470.

Fonnum F, Gottesfeld Z, Grofova I (1978). Distribution of glutamate decarboxylase, choline acetyl-transferase and aromatic amino acid decarboxylase in the basal ganglia of normal and operated rats. Evidence for striatopallidal, striatoentopeduncular and striatonigral GABAergic fibres. *Brain Res* **143**:125–38.

Fontanilla D, Johannessen M, Hajipour AR, Cozzi NV, Jackson MB, Ruoho AE (2009). The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous Sigma-1 receptor regulator. *Science* **323**: 934- 937.

Gebreselassie D, Bowen WD (2004). σ 2 receptors are specially localized to lipid rafts in rat liver membranes. *Eur J Pharmacol* **493**: 19–28.

Geracitano R, Federici M, Prisco S, Bernardi G, Mercuri NB (2004). Inhibitory effects of trace amines on rat midbrain dopaminergic neurons. *Neuropharmacology* **46**: 807-814.

Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC (1989). Alternative splicing directs the expression of two D2 receptor isoforms. *Nature* **342**: 923-926.

Grace AA, Bunney BS (1983). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons. I. Identification and characterization. *Neuroscience* **10**:301-315.

Grandy DK (2007). Trace amine-associated receptor 1—Family archetype or iconoclast? *Pharmacol Ther* **116**: 355–390.

Grillner P, Mercuri NB (2002). Intrinsic membrane properties and synaptic inputs regulating the firing activity of the dopamine neurons. *Behav Brain Res* **130**: 149-169.

Groves PM, Wilson CJ, Young SJ, Reber GV (1975). Self-inhibition by dopaminergic neurons. *Science* **190**: 522– 529.

Gundlach AL, Largent BL, and Snyder SH (1986) Autoradiographic localization of sigma receptor binding sites in guinea pig and rat central nervous system with (3 H)-3-(3-hydroxyphenyl)-N-(1-propyl)piperidine. *J Neurosci* **6**: 1757–1770.

Hadjiconstantinou M, Rossetti Z, Silvia C, Krajnc D, Neff NH (1988). Aromatic L-amino acid decarboxylase activity of the rat retina is modulated in vivo by environmental light. *J Neurochem* **51**: 1560–1564.

Hart ME, Suchland KL, Miyakawa M, Bunzow JR, Grandy DK, Scanlan TS (2006). Trace amine-associated receptor agonists: synthesis and evaluation of thyronamines and related analogues. *J Med Chem* **49**: 1101–1112.

Heller B, Fischer E, Martin R. (1976). Therapeutic action of D-phenylalanine in Parkinson's disease. *Arzneimittelforschung* **26**: 577-9.

Heller B, Fischer E. (1973). Diminution of phenethylamine in the urine of Parkinson patients. *Arzneimittelforschung* **23**: 884-6.

Hellewell SB, Bowen WD (1990). A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma (PC12) cells: decreased affinity for (+)-benzomorphans and lower molecular weight suggest a different sigma receptor form from that in guinea pig brain. *Brain Res* **527**: 244-253.

Henry DP, Russell WL, Clemens JA, Plebus LA (1988). Phenylethylamine and p-tyramine in the extracellular space of the rat brain: quantification using a new radioenzymatic assay and in situ microdialysis. In: Boulton, A.A., Juorio, A.V., Downer, R.G.H. (Eds.), Trace Amines: Comparative and Clinical Neurobiology. Humana Press, Clifton 239–250.

Howes OD, Kapur S (2009). The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III-the final common pathway. *Schizophr Bull* **35**:549-62.

Huang CL, Feng S, Hilgemann DW (1998). Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by G $\beta\gamma$. *Nature* **391**: 803–806.

Humphries MD, Prescott (2010). The ventral basal ganglia, a selection mechanism at the crossroads of space, strategy, and reward. *Prog Neurobiol* **90**: 385–417.

Inanobe A, Fujita S, Makino Y, Matsushita K, Ishii M, Chachin M et al. (2001). Interaction between the RGS domain of RGS4 with G protein alpha subunits mediates the voltage-dependent relaxation of the G protein-gated potassium channel. *J Physiol* **535**: 133-143.

Inanobe A, Yoshimoto Y, Horio Y, Morishige KI, Hibino H, Matsumoto S, Tokunaga Y, Maeda T, Hata Y, Takai Y, Kurachi Y (1999). Molecular cloning and characterization of a novel splicing variant of the Kir3.2 subunit predominantly expressed in mouse testis. *J Physiol* **521**:19–30.

Ishii M, Inanobe A, Kurachi Y (2002). PIP3 inhibition of RGS protein and its reversal by Ca²⁺/calmodulin mediate voltage-dependent control of the G protein cycle in a cardiac K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4325-4330.

Isomoto S, Kondo C, Takahashi N, Matsumoto S, Yamada M, Takumi T, Horio Y, Kurachi Y (1996). A novel ubiquitously distributed isoform of GIRK2 (GIRK2B) enhances GIRK1 expression of the G-protein-gated K⁺ current in *Xenopus* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 286–291.

Itzhak Y, Stein I, Zhang SH, Kassim CO, Cristante D (1991). Binding of sigma-ligands to C57BL/6 mouse brain membranes: effects of monoamine oxidase inhibitors and subcellular distribution studies suggest the existence of sigma-receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **257**: 141-148.

Jaeger CB, Ruggiero DA, Albert VR, Park DH, Joh TH, Reis DJ (1984). Aromatic L-amino acid decarboxylase in the rat brain: immunocytochemical localization in neurons of the brain stem. *Neuroscience* **11**: 691–713.

Jansen SC, van Dusseldorp M, Bottema KC, Dubois AEJ (2003). Intolerance to dietary biogenic amines: a review. *Ann Allergy Asthma Immunol* **91**: 233–241.

Janssen PA, Leysen JE, Megens AA, Awouters FH (1999). Does phenylethylamine act as an endogenous amphetamine in some patients? *Int J Neuropsychopharmacol* **2**: 229–240.

Jeanneret J (1877). Untersuchungen über die Zersetzung von Gelatine und Eiweiss durch die geformten Pankreasfermente bei Luftausschluss. *J Prakt Chem* **15**: 353–390.

Juorio AV (1982). The effects of some antipsychotic drugs, D-amphetamine, and reserpine on the concentration and rate of accumulation of tryptamine and 5-hydroxytryptamine in the mouse striatum. *Can J Physiol Pharmacol* **60**: 376–380.

Juorio AV (1988). Brain β -phenylethylamine: localization, pathways, and interaction with catecholamines. In: Sandler, M., Dahlström, A., Belmaker, R.H. (Eds.), *Progress in Catecholamine Research: Central Aspects. Neurology and Neurobiology*, vol. 42B. Alan R. Liss, New York, pp. 433–437.

Kebabian JW, Calne DB (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature* **277**: 93–96.

Khan ZU, Mrzljak L, Gutierrez A, de la Calle A, Goldman-Rakic PS (1998). Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7731–7736.

Kitahama K, Denoyer M, Raynaud B, Borri-Voltattorni C, Weber M, Jouvet M (1990). Aromatic L-amino acid decarboxylase immunohistochemistry in the cat lower brainstem and midbrain. *J Comp Neurol* **302**: 935–953.

Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K (2006). Inhibition of G Protein-activated inwardly rectifying K^+ channels by ifenprodil. *Neuropsychopharmacology* **31**: 516–524.

Kopin IJ, Fischer JE, Musacchio J, Horst WD (1964). Evidence for a false neurochemical transmitter as a mechanism for the hypotensive effect of monoamine oxidase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **52**: 716–721.

Kosa E, Marcilhac-Flouriot A, Fache MP, Siaud P (2000). Effects of beta-phenylethylamine on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav* **67**: 527–535.

Kuroki T, Tsutsumi T, Hirano M, Matsumoto T, Tatebayashi Y, Nishiyama K, Uchimura H, Shiraishi A, Nakahara T, Nakamura K (1990). Behavioral sensitization to beta-phenylethylamine (PEA): enduring modifications of specific dopaminergic neuron systems in the rat. *Psychopharmacology* **102**: 5–10.

Kusaga A (2002). Decreased beta-phenylethylamine in urine of children with attention deficit hyperactivity disorder and autistic disorder. *No To Hattatsu* **34**: 243-248.

Labouebe G, Lomazzi M, Cruz HG, Creton C, Luijan R, Li M, et al. (2007). RGS2 modulates coupling between GABA_B receptors and GIRK channels in dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Nat Neurosci* **10**: 1559-1568.

Lacey MG, Mercuri NB, North RA (1987). Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of rat substantia nigra zona compacta. *J Physiol* **392**: 397-416.

Langer SZ & Rubio MC (1973). Effects of the noradrenaline metabolites on the adrenergic receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **276**: 71-88.

Lapin IP, Ovxenkrug GF (1969). Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. *Lancet* **1**: 132-136.

Liao YJ, Jan YN & Jan LY (1996). Heteromultimerization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel proteins GIRK1 and GIRK2 and their altered expression in weaver brain. *J Neurosci* **16**: 7137-7150.

Locock RA, Baker GB, Coutts RT, Dewhurst WG (1984). Displacement of serotonin from binding sites in rat cortex: the effects of biogenic trace amines. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **8**: 701-704.

Lupardus PJ, Wilke RA, Aydar E, Palmer CP, Chen Y, Ruoho AE et al. (2000). Membrane-delimited coupling between sigma receptors and K⁺ channels in rat neurohypophysial terminals requires neither G-protein nor ATP. *J Physiol* **526**: 527-539.

Luscher C, Slesinger PA (2010). Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nature Rev Neurosci* **11**:301-315.

Lyles GA (1994). Properties of mammalian tissue-bound semicarbazide-sensitive amine oxidase: possible clues to its physiological function? *J Neural Transm Suppl* **41**: 387-396.

Magyar K, Meszaros Z, Matyus P (2001). Semicarbazide-sensitive amine oxidase. Its physiological significance. *Pure Appl Chem* **73**: 1393-1400.

Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE (1976). The effects of morphine and nalorphine like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* **197**: 517–532.

Mercuri NB, Bernardi G (2005). The “magic” of L-Dopa: why is it the gold standard Parkinson’s disease therapy? *Trends Pharmacol Sci* **26**:341-344.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **78**: 1190-225.

Monassier L, Manoury B, Bellocq C, Weiwwenburger J, Grenay H, Zimmermann D et al. (2007). σ_2 -receptor ligand-mediated inhibition of inwardly rectifying K^+ channels in the heart. *J Pharmacol Exp Ther* **322**: 341-350.

Monnet FP, Maurice T (2006). The sigma-1 protein as a target for the non-genomic effects of neuro(active)steroids: molecular and behavioural aspects. *J Pharmacol Sci* **100**: 93–118.

Mosnaim AD, Wolf ME (1980). Noncatecholic phenylethylamines parts 1 and 2. New York: Marcel Dekker.

Nakamura M, Ishii A, Nakahara D (1998). Characterization of β -phenylethylamine induced monoamine release in rat nucleus accumbens: a microdialysis study. *Eur J Pharmacol* **349**: 163–169.

Nencki M (1876). Festchrift für 40 jähriges Jubiläum des Prof. Bern: Valentin.

Nguyen VH, Ingram SL, Kassiou M, Christie MJ (1998). σ -Binding sites ligands inhibit K^+ currents in rat locus coeruleus neurons in vitro. *Eur J Pharmacol* **361**: 157-163.

Niddam R, Arbilla S, Baud P, Langer SZ (1985). [3H]-b-phenylethylamine, but not [3H]-(+)-amphetamine is released by electrical stimulation from perfused rat striatal slices. *Eur J Pharmacol* **110**: 121–124.

Niddam R, Arbilla S, Baud P, Langer, S.Z., 1985. [3H]-b-phenylethylamine, but not [3H]-(+)-amphetamine is released by electrical stimulation from perfused rat striatal slices. *Eur J Pharmacol* **110**: 121–124.

O’Reilly RL, Davis BA (1994). Phenylethylamine and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **18**: 63–75.

- Paterson IA, Juorio AV, Boulton AA (1990). 2-Phenylethylamine: a modulator of catecholamine transmission in the mammalian central nervous system? *J. Neurochem.* **55**: 1827–1837.
- Paterson IA (1993). The potentiation of cortical neuron responses to noradrenaline by 2-phenylethylamine is independent of endogenous noradrenaline. *Neurochem Res* **18**: 1329-36.
- Peleg, S., Varon, D., Ivanina, T., Dessauer, C. W. & Dascal, N. Gai controls the gating of the G proteinactivated K⁺ channel, GIRK. *Neuron* **33**: 87–99.
- Philips SR, Boulton AA (1979). The effect of monoamine oxidase inhibitors on some arylalkylamines in rat striatum. *J Neurochem* **33**: 159–167.
- Philips SR, Robson AM (1983). In vivo release of endogenous dopamine from the rat caudate nucleus by phenylethylamine. *Neuropharmacology* **22**: 1297–1301.
- Philips SR, Rozdilsky B, Boulton AA (1978). Evidence for the presence of m-tyramine, p-tyramine, tryptamine, and phenylethylamine in the rat brain and several areas of the human brain. *Biol Psychiatry* **13**(1): 51–57.
- Phillipson OT (1979). Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: a horse-radish peroxidase study in the rat. *J Comp Neurol* **187**: 117–44.
- Pirri JK, McPherson AD, Donnelly JM, Francis MM, Alkema MJ (2009). A tyramine-gated chloride channel coordinates distinct motor programs of a *Caenorhabditis elegans* escape response. *Neuron* **62**: 526–538.
- Raiteri M, Del Carmen R, Bertollini A, Levi G (1977). Effect of sympathomimetic amines on the synaptosomal transport of noradrenaline, dopamine and 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol* **41**: 133–143.
- Richard L, Hauger T, Philskolnick, Steven MP (1982). Specific [3H]ISPhenylethylamine binding sited in rat brain. *Eur J Pharmacol* **83**: 147–148.
- Ringstad N, Abe N, Horvitz R (2009). Ligand gated chloride channels are receptors for biogenic amines in *C. elegans*. *Science* **325**: 96–100.
- Roeder T (2005). Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annu Rev Entomol* **50**: 447-77.

Rubinstein M, Peleg S, Berlin S, Brass D, Keren-Raifman T, Dessauer CW, Ivanina T, Dascal N (2009). Divergent regulation of GIRK1 and GIRK2 subunits of the neuronal G protein gated K⁺ channel by G_{ai}GDP and G_{βγ}. *J Physiol* **587**: 3473–3491.

Ruffieux A, Schultz W (1980). Dopaminergic activation of reticulata neurons in the substantia nigra. *Nature* **285**: 240–241.

Saavedra JM, Coyle JT, Axelrod J (1973). The distribution and properties of the non-specific N-methyltransferase in brain. *J Neurochem* **20**: 743–752.

Saavedra JM, Palkovitis M, Brownstein MJ, Axelrod J (1974). Localization of phenylethanolamine N-methyltransferase in the rat brain nuclei. *Nature* **248**: 695–696.

Sabelli HC, Fink P, Fawcett J, Tom C (1996). Sustained antidepressant effect of PEA replacement. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **8**: 168–171.

Sandler M, Reynolds GP (1976). Does phenylethylamine cause schizophrenia? *Lancet* **1**: 170–171.

Schildkraut JJ (1967). The catecholamine hypothesis of affective disorders. A review of supporting evidence. *Int J Psychiatry* **4**: 203–217.

Schultz W (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* **80**: 1–27.

Seeman P (1980). Brain dopamine receptors. *Pharmacol Rev* **32**: 230–313.

Snodgrass SR, Iverson LL (1974). Formation and release of 3H-tryptamine from 3H-tryptophan in rat spinal cord slices. *Adv Biochem Psychopharmacol* **10**:141–150.

Snyder SH (1976). The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor. *Am J Psychiatry* **133**: 197–202.

Spano PF, Govoni S, Trabucchi M (1978). Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv Biochem Psychopharmacol* **19**: 155-165.

Stefani EBF (1998). Cut-open oocyte voltage-clamp technique. *Meth Enzymol* **293**: 300–318.

Stoff DM, Jeste DV, Gillin JC, Moja EA, Cohen L, Stauderman KA, et al. (1984). Behavioral supersensitivity to β -phenylethylamine after chronic administration of haloperidol. *Biol Psychiatry* **19**: 101–106.

Stoof JC, Liem AL, Mulder AH (1976). Release and receptor stimulating properties of p-tyramine in rat brain. *Arch Int Pharmacodyn* **220**: 62-71.

Stuhmer W (1998). Electrophysiological recordings from *Xenopus* oocytes. *Meth Enzymol* **293**: 280–318.

Suppes T, Pinnock RD (1987). Sensitivity of neuronal dopamine response in the substantia nigra and ventral tegmentum to clozapine, metoclopramide and SCH 23390. *Neuropharmacology* **26**: 331-7.

Svensson TH, Tung CS (1989). Local cooling of prefrontal cortex induces pacemaker-like firing of dopamine neurones in rat ventral tegmental area in vivo. *Acta Physiol Scand* **136**: 11–8.

Tan ES, Groban ES, Jacobson MP, and Scanlan TS (2008). Toward deciphering the code to aminergic G protein-coupled receptor drug design. *Chem Biol* **15**: 343–353.

Tinklenberg JR, Gillin JC, Murphy GM, Staub R, Wyatt RJ (1978). The effects of phenylethylamine in rhesus monkeys. *Am J Psychiatry* **135**: 576–578.

Ungerstedt U (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl* **367**: 1–48.

Usdin E & Sandler M (1976). Trace amines and the brain: proceedings of a study group held at the fourteenth annual meeting of the American College of Neuropsychopharmacology. New York: Dekker.

Vaccari A (1986). High affinity binding of [3h]-tyramine in the central nervous system. *Br J Pharmacol* **89**: 15–25.

Wainscott DB, Little SP, Yin T, Tu Y, Rocco VP, He JX, and Nelson DL (2007). Pharmacologic characterization of the cloned human trace amine-associated receptor1 (TAAR1) and evidence for species differences with the rat TAAR1. *J Pharmacol Exp Ther* **320**: 475–485.

Walker JM, Bowen WD, Walker FO, Matsumoto RR, de Costa BR, and Rice KC (1990). Sigma receptors: biology and function. *Pharm Rev* **42**:355–402.

Waszczak BL (1990). Differential effects of D1 and D2 dopamine receptor agonists on substantia nigra pars reticulata neurons. *Brain Res* **513**: 125–135.

Waszczak BL, Walters JR (1986). Endogenous dopamine can modulate inhibition of substantia nigra pars reticulata neurons elicited by GABA iontophoresis or striatal stimulation. *J Neurosci* **6**: 120–126.

Wickman K, Karschin C, Karschin A, Picciotto MR & Clapham DE (2000). Brain localization and behavioral impact of the G-protein-gated K⁺ channel subunit GIRK4. *J. Neurosci* **20**: 5608–5615.

Wise RA (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature Rev Neurosci* **5**: 1-12.

Wu PH & Boulton AA (1973). Distribution and metabolism of tryptamine in rat brain. *Can J Biochem* **51**: 1104–1112.

Wyatt RJ (1978). In *The nature of Schizophrenia*. Wiley & Sons 116-125.

Xie Z, Miller GM (2007). Trace amine-associated receptor 1 is a modulator of the dopamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* **321**:128–36.

Xie Z, Miller GM (2009a). Trace amine-associated receptor 1 as a monoaminergic modulator in brain. *Biochem Pharmacol* **78**: 1095–1104.

Xie Z, Miller GM (2009b). A receptor mechanism for methamphetamine action in dopamine transporter regulation in brain. *J Pharmacol Exp Ther* **330**: 316-25.

Xie Z, Westmoreland SV, Miller GM (2008). Modulation of monoamine transporters by common biogenic amines via trace amine associated receptor 1 and monoamine autoreceptors in human embryonic kidney 293 cells and brain synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther* **325**: 629–640.

Yang HY, Neff NH (1973). Beta-phenylethylamine: a specific substrate for type B monoamine oxidase of brain. *J Pharmacol Exp Ther* **187**: 365–371.

Zhang H, He C, Yan X, Mirshahi T, Logothetis DE (1999). Activation of inwardly rectifying K⁺ channels by distinct PtdIns(4,5)P₂ interactions. *Nature Cell Biol.* **1**: 183–188.

Zhu MY, Juorio AV, Paterson IA, Boulton AA (1992). Regulation of aromatic L-amino acid decarboxylase by dopamine receptors in the rat brain. *J Neurochem* **58**: 636–641.

Zhu MY, Juorio AV, Paterson IA, Boulton AA (1994). Regulation of aromatic L-amino acid decarboxylase in rat striatal synaptosomes: effects of dopamine receptor agonists and antagonists. *Br J Pharmacol* **112**: 23–30.

Zucchi R, Chiellini G, Scanlan TS, Grandy DK (2006). Trace amine-associated receptors and their ligands. *Br J Pharmacol* **149**: 967–78.